

Sada laboratorních úloh pro předmět Biochemie

Biochemical Laboratory Techniques: Laboratory experiments

Michaela Nečasová

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Iveta Bryjová

Ostrava, 2021

Abstrakt

Cílem bakalářské práce je přehledně shrnout biochemické principy využívané v lékařských diagnostických metodách. V teoretické části práce jsou rozebrány základní biochemické organické látky (sacharidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, peptidy) a principy využívaných biochemických laboratorních metod. Praktická část se zabývá zpracováním laboratorních úloh, které jsou založeny na kolorimetrických, spektrofotometrických, chromatografických a chemických metodách a jsou důležité pro laboratorní diagnostiku v lékařství (klinické biochemii). Nedílnou součástí práce jsou experimentálně ověřené laboratorní úlohy, které jsou vhodné pro realizaci mimo specializovanou laboratoř, a následně uvedeny jednotlivé výsledky a závěry použitých metod. Výstup práce může posloužit jako výukový materiál pro praktickou a teoretickou výuku předmětu biochemie apod.

Klíčová slova

biochemické principy; lékařské diagnostické metody; biochemie; sacharidy; proteiny; lipidy; nukleové kyseliny; peptidy; kolorimetrie; spektrofotometrie; chromatografie; klinická biochemie; laboratorní úlohy

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to clearly summarize biochemical principles used in medical diagnostic methods. The theoretical part of the thesis analyses the basic biochemical organic substances (carbohydrates, proteins, lipids, nucleic acids, peptides) and principles of used biochemical laboratory methods. The practical part deals with processing of laboratory tasks that are based on colorimetric, spectrophotometric, chromatographic and chemical methods, and are important for laboratory diagnostic in medicine (clinical biochemistry). The integral part of the thesis is dedicated to experimentally verified laboratory tasks, which are suitable for implementation outside a specialized laboratory, and then the individual results and conclusions of used methods. The output of this thesis can serve as teaching material for practical and theoretical teaching of biochemistry, etc.

Key words

biochemical principles; medical diagnostic methods; biochemistry; carbohydrates; proteins; lipids; nucleic acids; peptides; colorimetry; spectrophotometry; chromatography; clinical biochemistry; laboratory tasks

Poděkování

Ráda bych poděkovala paní Ing. Ivetě Bryjové za odbornou pomoc a konzultaci při vytváření této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Mgr. Jaroslavu Šťastnému a paní RNDr. Aleně Havlíkové z Gymnázia a SOŠ Pedagogické Liberec, Jeronýmova za poskytnutí laboratoří k realizaci úloh. Velice ráda bych také poděkovala paní Marcelle Krejčíkové z Technické univerzity v Liberci, která mi zapůjčila chemikálie a potřebné materiály. Nakonec bych chtěla poděkovat panu Vladimíru Kurfürstovi, primáři centrálních laboratoří Slezské nemocnice v Opavě, za poskytnutí spektrofotometru potřebného k realizaci úloh.

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek.....	6
Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů	8
Úvod	11
Cíl práce	11
Struktura práce.....	12
Literární rešerše.....	13
Elektrochemické senzory glukózy integrované do smartphonu	13
TLC chromatografie acylglycerolů	16
Optický spektrometr na smartphonu pro měření hemoglobinu.....	20
Přímý screening aktivity enzymů pomocí elektrosprejové ionizace.....	24
Teoretická část	
1 Úvod do biochemie	29
1.1 Vývoj biochemie	29
1.2 Biochemie	30
1.2.1 Sacharidy	32
1.2.2 Tuky	33
1.2.3 Bílkoviny	34
1.2.4 Nukleové kyseliny	34
1.2.5 Peptidy.....	35
1.3 Klinická biochemie.....	35
2 Laboratorní vyšetřovací metody	37
2.1 Biochemické parametry vyšetření a vyšetřované materiály	38
2.2 Dělení vyšetřovacích metod	39
Praktická část	
3 Sada laboratorních úloh	44
3.1 Zásady práce v laboratořích	44
3.2 Identifikace aminokyselin.....	46
3.3 Stanovení proteinů	53
3.4 Identifikace lipidů	58
3.5 Enzymové reakce na pH	64
4 Výsledky realizovaných úloh.....	68

4.1	Úloha: Identifikace aminokyselin	68
4.2	Úloha: Stanovení proteinů	73
4.3	Úloha: Identifikace lipidů.....	80
4.4	Úloha: Enzymové reakce na pH.....	84
Závěr		87
Použitá literatura.....		89
Dodatek A. Základy chemie		92
Dodatek B. Sacharidy.....		97
Dodatek C. Lipidy.....		106
Dodatek D. Aminokyseliny		112
Dodatek E. Další přírodní látky		122
Dodatek F. Nukleové kyseliny		124
Dodatek G. Seznam pomůcek a materiálů		126

Seznam použitých symbolů a zkratek

Symbol	Jednotky	Význam symbolu
A		Absorbance
c	mol/dm ³	Glykemická koncentrace
F		Kalibrační faktor
G	J	Gibbsova energie
H	J	Entalpie
M	kg/mol	Molární hmotnost
n	mol	Látkové množství
pI		Izoelektrický bod
Q		Teplo
R _F		Retenční faktor
S	J/K	Entropie
T		Transmittance
U	J	Vnitřní energie
w	%	Hmotnostní zlomek
W	J	Mechanická práce

Zkratka	Význam
AGL	Acylglycerol
ATP	Adenosine triphosphate
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
DAG	Diacylglycerol
DESI	Desorption electrospray ionization
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRS	Diffuse reflectance spectroscopy
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray ionization
HTS	High Throughput Screening
HPLC	High-performance liquid chromatography

IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IR-MALDESI	Infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization
IgA	Immunoglobulin A
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
MAG	Monoacylglycerol
MALDESI	Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MS	Mass spectrometry
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
POCT	Point of care testing
RNA	Ribonucleic acid
RP	Relative performance
TAG	Triacylglycerol
TLC	Thin-layer chromatography
UV/VIS	Ultraviolet-visible

Seznam použitých obrázků, tabulek a grafů

Obrázek i Glukometrické pouzdro, aplikace pelety a blokové schéma funkčního elektrického obvodu.	13
Obrázek ii Screenshoty displejů aplikací pro opakované měření čtyř různých koncentrací.	14
Obrázek iii Schématické zobrazení TLC separace jednoduchých lipidů na tenké vrstvě silikagelu.	17
Obrázek iv Rozložení tříd látek pomocí metody C.	18
Obrázek v Rozložení tříd látek pomocí metody D.	18
Obrázek vi (a) Schéma G-Fresnelova spektrometru.	21
Obrázek vii Shrnutí očekávaných koncentrací hemoglobinu.	22
Obrázek viii Spektrum difuzní odrazivosti 16 fantomů.	22
Obrázek ix Porovnání chyb stolního a chytrého spektrometru u měření jednotlivých parametrů.	23
Obrázek x Schéma zdroje IR-MALDESI upravené pro přímou analýzu vzorků z jamek destiček.	25
Obrázek xi Vypočtená procentuální přeměna isocitrátu na α -KG (A) a NADP + na NADPH (B).	26
Obrázek xii Výsledky studie pseudo-HTS.	27
Obrázek 1.1 Fotografie německého chemika Emila Hermanna Fischera.	30
Obrázek 1.2 Schéma rozdělení nejdůležitějších organických látek v biochemii.	31
Obrázek 1.3 Schéma rozdělení lipidů.	33
Obrázek 1.4 Schéma ideálního organizačního rozdělení oddělení laboratorní medicíny.	36
Obrázek 2.1 Schéma dělení laboratorních vyšetřovacích metod.	37
Obrázek 2.2 Schéma dělení vyšetřovacích metod dle principu metody.	39
Obrázek 3.1 Ninhydrinová reakce.	48
Obrázek 3.2 Ninhydrinová reakce: reakce glycinu a prolinu.	48
Obrázek 3.3 Schéma TLC metody.	50
Obrázek 3.4 Seznam kyselin a jejich acidobazických vlastností.	50
Obrázek 3.5 Ukázka kalibračního grafu.	55
Obrázek 3.6 Princip funkce kyvetového spektrofotometru.	55
Obrázek 3.7 Strukturní vzorec cholesterolu.	60
Obrázek 3.8 Strukturní vzorec lecitinu.	60
Obrázek 3.9 Schéma optického mikroskopu.	61
Obrázek 4.1 Laboratorní váha OHAUS Scout.	69
Obrázek 4.2 Připravené roztoky jednotlivých aminokyselin.	69
Obrázek 4.3 Ninhydrinový roztok (0,2%).	69
Obrázek 4.4 Zahřívání zkumavek obsahujících roztok ninhydrinu a roztok vzorků aminokyselin.	69
Obrázek 4.5 Butanol a kyselina octová na tvorbu mobilní fáze (vlevo). Probíhající metoda TLC (vpravo).	71
Obrázek 4.6 Vzorky na TLC destičce. A značí alanin, T značí tyrosin a G je glycin.	71
Obrázek 4.7 Vyznačení skvrn a čela po TLC metodě. Zvýraznění délek a, b.	71
Obrázek 4.8 Roztok bílkovin a krystalky močoviny.	73
Obrázek 4.9 Roztoky NaOH a CuSO ₄	73
Obrázek 4.10 Ztuhnutí získaného biuretu.	73
Obrázek 4.11 Konečné zbarvení roztoku bílkovin.	73
Obrázek 4.12 UV/VIS spektrofotometr BK-S380.	75
Obrázek 4.13 1. až 8. bod k postupu měření absorbancí vzorků na spektrofotometru.	75
Obrázek 4.14 9. až 14. bod k postupu měření absorbancí vzorků na spektrofotometru.	76
Obrázek 4.15 Kádinka s vodou (blank), kyveta se standardem a roztok BSA (sérového hovězího albuminu).	76
Obrázek 4.16 Sestavená filtrační aparatura s filtrovaným vzorkem.	80
Obrázek 4.17 Rozdílné zbarvení filtrátů. Na dně zkumavky je vysrážený lecitin.	80
Obrázek 4.18 Výsledné zbarvení filtrátu po přidání anhydridu a kyseliny sírové.	81

Obrázek 4.19 Filtrační aparatura na tvorbu filtrátu. Výsledný důkaz pH hydrolyzátu.....	81
Obrázek 4.20 Zbarvení hydrolyzátu lecitinu v přítomnosti Lugolova roztoku. Krystalky vzniklé reakcí.	82
Obrázek 4.21 Použitý mikroskop Biolux NV, firma Bresser.	82
Obrázek 4.22 Roztok škrobu , Lugolův roztok a pH papírky.	84
Obrázek 4.23 Příprava jednotlivých pufrů podle tabulky.	84
Obrázek 4.24 Výsledné zbarvení kapky Lugolova roztoku po přidání enzymu o různém pH ze zkumavek.	85
Obrázek A.1 Schématické zobrazení jednoduchých a násobných kovalentních vazeb.	93
Obrázek A.2 Příklad značení vodíkové vazby v peptidovém řetězci.	94
Obrázek B.1 Zobrazení řetězců nejjednodušších monosacharidů.	98
Obrázek B.2 Zobrazení řetězců aldóz a ketóz pomocí Fischerovy projekce.	98
Obrázek B.3 Cyklizace monosacharidů a jejich zobrazení pomocí tří různých projekcí.....	99
Obrázek B.4 Haworthovy vzorce vybraných monosacharidů.	99
Obrázek B.5 Haworthovy vzorce vybraných disacharidů se sumárním vzorcem $C_{12}H_{22}O_{11}$	101
Obrázek B.6 Haworthovy vzorce stavebních jednotek některých polysacharidů.....	102
Obrázek B.7 Schéma metody papírové chromatografie.....	105
Obrázek C.1 Řetězce vybraných tuků a vosků.	107
Obrázek C.2 Řetězce vybraných glycerofosfolipidů.	108
Obrázek C.3 Řetězce vybraných steroidů.	109
Obrázek D.1 Zobrazení struktury aminokyselin a jejich konfigurace.....	112
Obrázek D.2 Struktura nepolárních aminokyselin.	113
Obrázek D.3 Struktura polárních aminokyselin.	114
Obrázek D.4 Struktura bazických aminokyselin.....	115
Obrázek D.5 Struktura kyselých aminokyselin.....	115
Obrázek D.6 Sekundární struktury.....	117
Obrázek D.7 Dělení směsi aminokyselin na katexovém iontoměnič.	119
Tabulka 2.1 Přehled optických metod.	40
Tabulka 2.2 Přehled elektrochemických metod.	41
Tabulka 3.1 Obsahy jednotlivých zkumavek.	51
Tabulka 3.2 Výpočetní rozbor roztoků a vzorků.	52
Tabulka 3.3 Retenční faktory a izoelektrické body.	52
Tabulka 3.4 Příprava standardů.....	56
Tabulka 3.5 Rozbor kalibračního grafu a jednotlivých vzorků.	57
Tabulka 3.6 Příprava jednotlivých pufrů.....	66
Tabulka 3.7 Reakce α -amylázy.....	67
Tabulka 4.1 Hotový výpočetní rozbor roztoků a vzorků.	68
Tabulka 4.2 Fotodokumentace výsledného zbarvení vzorků aminokyselin.	70
Tabulka 4.3 Získané retenční faktory a izoelektrické body.....	71
Tabulka 4.4 Příprava standardů.....	74
Tabulka 4.5 Rozbor kalibračního grafu a jednotlivých vzorků při vlnové délce: $\lambda = 595 \text{ nm}$	77
Tabulka 4.6 Výsledky reakce α -amylázy.	85
Tabulka B.1 Přehled nejdůležitějších metod v chromatografii	104
Tabulka C.1 Přehled vybraných mastných kyselin.	106
Tabulka D.1 Přehled aminokyselin s nepolárním postranním řetězcem.	113
Tabulka D.2 Přehled aminokyselin s polárním postranním řetězcem.	114
Tabulka D.3 Přehled bazických aminokyselin.	114
Tabulka D.4 Přehled kyselých aminokyselin.	115

Tabulka D.5 Přehled globulárních, fibrilárních a membránových proteinů.....	118
Graf 1: Absorpční křivka roztoku sérového hovězího albuminu o neznámé koncentraci.	77
Graf 2: Výsledná kalibrační křivka měření absorbance albuminu.	78
Graf 3: Vliv pH na rychlost reakce enzymu α -amylázy.	85

Úvod

Slovo chemie pochází z řeckého slova „*chemi*“, v překladu černá země. Biochemie je vědní obor, který se zabývá poznáním, ovládnutím a využitím zákonitostí, kterými se řídí přírodní děje a metabolismy živých i neživých látek. Odvětví biochemie bylo často označováno jako „fyzilogická chemie“. Samotný termín „biochemie“ vytvořil Carl Alexander Neuberg v roce 1903. Chemie se obecně dělí do několika oborů – analytická chemie, biochemie, anorganická chemie, organická chemie a fyzikální chemie [1].

Biochemii lze definovat jako vědu, která se na molekulární úrovni zabývá studiem živých organismů, vyvinula se z organické chemie. V práci se budeme věnovat biochemii popisné. Ta zkoumá složení látek, jejich specifickou strukturu a jednotlivé vlastnosti. Obecně se zabývá látkovým složením živé hmoty, kde pojem živá hmota definuje soubor molekul a iontů biogenních prvků. Neznámější a nejvíce zastoupenou biomolekulou v lidském těle je voda. Je to základní biomolekula pro všechny živé organismy, kde není voda, tam nemůže být život. Biogenní prvky a biomolekuly tvoří složitější biopolymery neboli organické sloučeniny. V oboru biochemie dělíme tyto biopolymery na sacharidy, lipidy, aminokyseliny, přírodní látky a nukleové kyseliny. Aminokyseliny dále tvoří struktury proteinů a peptidů. V této bakalářské práci se budeme zabývat pouze aplikací biochemie v medicíně, tedy klinickou biochemií [1].

Klinická biochemie je lékařský obor, který přispívá ke stanovení diagnózy onemocnění a ke kontrole účinnosti terapie. Dle IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) je definována jako: „*Klinická biochemie je aplikací chemických, molekulárních a buněčných principů a technologií s účelem porozumět lidskému zdraví a nemoci a umožnit jejich hodnocení.*“ [21]. Obor čerpá teoretické znalosti z biochemie a patobiochemie [6].

V klinické biochemii je vyšetřováno obrovské množství parametrů. Ať se jedná o biochemické vyšetření onemocnění srdce, onemocnění plic či dýchacích cest, vyšetření zánětlivých procesů, nádorových onemocnění, onemocnění krve či neurologických onemocnění. K nejznámějším laboratorním metodám používaným v klinické biochemii řadíme optické, elektrochemické, elektroforetické, chromatografické, fyzikální a analytické metody. Vyšetření bývají často aplikována na vzorky krve, moči a stolice [4].

Rozvoj citlivosti a přesnosti biochemických laboratorních metod, ale i přístrojů, je velice důležitý pro vývoj lékařství. Principy a metody jdou neustále dopředu a většina vyšetření je automatizovaná pomocí elektrických obvodů v novodobých zařízeních. Diagnostické metody hrají zásadní roli v léčbě pacienta, proto je nutné pracovat na jejich vývoji a implementaci.

Cíl práce

Cílem této práce je zpracovat přehledné a stručné shrnutí biochemických laboratorních principů využívaných v diagnostických laboratořích. Vzhledem k šíři problematiky s přihlédnutím na dodržení rozsahu práce v přijatelných mezích se zaměřuje pouze na laboratorní vyšetření základních organických látek (sacharidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, peptidy). Dále jsou v práci jen velmi

stručně rozebrány druhy a principy vyšetřovacích metod, které by mohly být využity v praktické části této práce.

Cílem teoretické části a dodatků uvedených v obsahu je přiblížit danou problematiku a vytvořit souhrn informací o biochemických vyšetřeních. Jelikož by tato práce mohla sloužit jako výukový materiál pro obor biomedicínského inženýrství aj., v dodatcích je poměrně podrobně rozebrána oblast biochemie a metody identifikace biochemických organických látek.

Cílem praktické části je vytvořit soubor laboratorních úloh, které by mohly být natolik nenáročné, aby byly realizovatelné ve výukových učebnách VŠB – TU Ostravy, namísto specializovaných chemických laboratoří. Úlohy by mohly sloužit jako výukový materiál pro laboratorní cvičení.

Struktura práce

Tato bakalářská práce je rozčleněna na část teoretickou, část praktickou a část s dodatky. Teoretická část sestává ze stručné kapitoly 1, která se věnuje úvodu do oblasti biochemie, jejímu vývoji a zároveň dělení základních organických látek. Konec této kapitoly je věnován klinické biochemii, která je na oboru biochemie založena. Kapitola 2 se věnuje vyšetřovacím laboratorním metodám, které jsou využívány k identifikaci a stanovení organických biochemických látek. V kapitole je nejen jejich dělení, ale také stručný popis jejich principu a využití.

Praktická část obsahuje kapitolu 3 s představením laboratorního řádu. Dále obsahuje vzory čtyř laboratorních protokolů, vytvořených dle zadání této práce na téma: identifikace aminokyselin, stanovení proteinů, identifikace lipidů a reakce enzymů na pH. V kapitole 4 jsou výsledky všech realizovaných úloh a k nim vypracované kontrolní otázky z protokolů. Všechny tyto výsledky jsou zhodnoceny v závěru práce. Tato práce je doplněna o část s dodatky, kde jsou uvedeny rozsáhlejší teoretické znalosti týkající se oboru biochemie. Zároveň je v dodatcích uspořádán seznam potřebných pomůcek a materiálů s internetovými odkazy.

Literární rešerše

Elektrochemické senzory glukózy integrované do smartphonu

[16] **Originální název:** BANDODKAR, Amay J., Somayeh IMANI, Rogelio NUÑEZ-FLORES, Rajan KUMAR, Chiyi WANG, A.M. Vinu MOHAN, Joseph WANG a Patrick P. MERCIER. *Re-usable electrochemical glucose sensors integrated into a smartphone platform. Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, 101, 181-187 [cit. 2020-12-20]. DOI: 10.1016/j.bios.2017.10.019. ISSN 09565663.

Český název: Opakovaně použitelné elektrochemické senzory glukózy integrované do platformy smartphonu

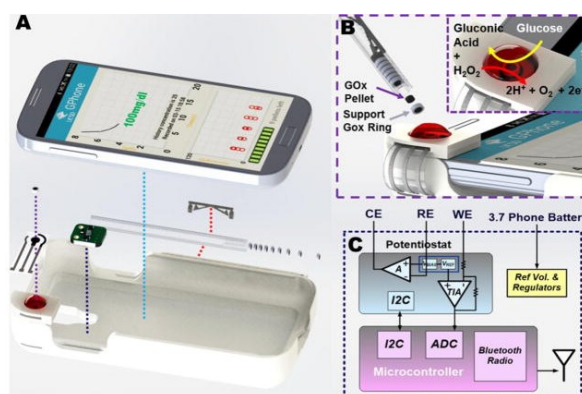
Úvod

Tento článek reprezentuje nový opakovaně použitelný digitální glukometr založený na platformě smartphonu. Glukometr obsahuje na míru vytvořené pouzdro pro chytrý telefon, ve kterém je uložen permanentní holý sensorový proužek, stylus, který je nabitý enzymatickými uhlíkatými peletami a obvody sensorových přístrojů. Na systém Android byla vyvinuta softwarová aplikace, která umožňuje snadné a jasné zobrazení měřené koncentrace glukózy. K měřicí metodě jsou využívány tzv. pelety (enzymatické pilulky) a práce ilustruje význam tohoto systému. Cílem je seznámit čtenáře s existencí opakovaně použitelného kapesního glukometru.

Metodika

Typický test zahrnuje načtení softwaru uživatelem, přípravu enzymatické pilulky na holý sensorový proužek připevněný k pouzdru pomocí dotykového pera a vložení vzorku. Elektronický modul poté získává a bezdrátově přenáší data do aplikačního softwaru, který se zobrazí na obrazovce. Nasazená peleta (enzymatická pilulka) se poté zahodí, aby se znovu získal povrch holého senzoru. Enzym naplněný v peletách je stabilní až 8 měsíců při normálních okolních podmínkách.

Metoda je realizována pomocí glukometru složeného ze dvou glukózových senzorů. První část má zabudovaný pasivní sensorový proužek skládající se ze tří elektrod elektrochemického měřicího systému, i když v tomto případě je pracovní elektroda vyrobena z uhlíku bez trvalé funkcionalizace. Druhá část zahrnuje biokatalytickou peletu, která selektuje glukózu v horní části pracovní elektrody. Peleta je nízký kruhově zabalený disk obsahující aktivní složku senzoru. Nachází se zde oxid glukózooxidázy a rhodia.

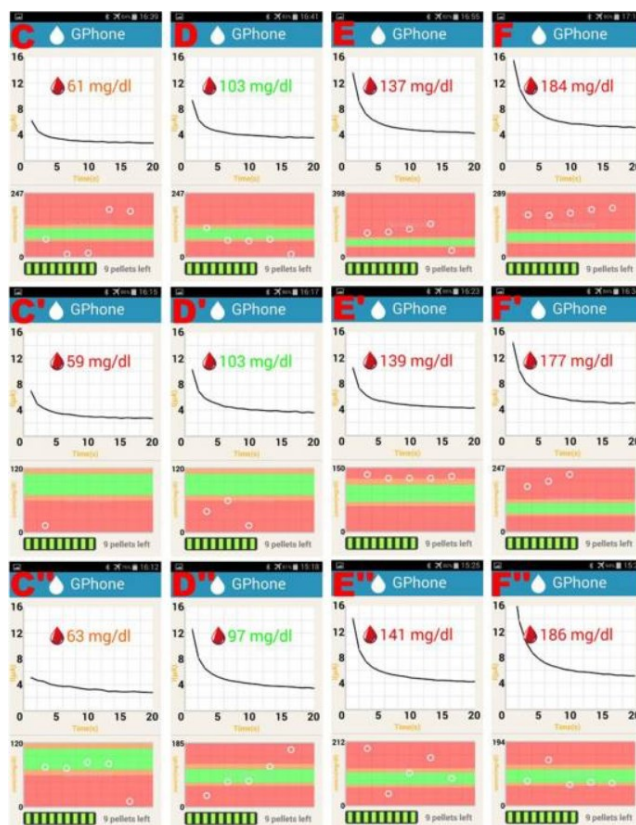


Obrázek 1 (A) Glukometrické pouzdro. (B) Aplikace pelety. (C) Blokové schéma funkčního elektrického obvodu.

V práci byla zkoumána funkce daného glukometru. K výzkumu byla použita deska plošných spojů, jelikož nebyl přístup k internímu zařízení pro chytré telefony. Využit byl potenciostat k pohonu elektrochemického biosenzoru na 0,4 V a odečtu odpovídajícího proudu (ampérmetr s konstantním potenciálem).

Podproces pozadí posílá digitálně zpracovanou aktuální hodnotu do programu. Obslužný program zařízení nejdříve resetuje čítač, ten zapisuje aktuální hodnoty po dobu 20 sekund a poté obsluha provede koncentraci glukózy v ploše. Na základě naměřené hodnoty proudu v časovém úseku 10 sekund je výsledná koncentrace uvedena na ploše. Celková přesnost glukometru závisí na peletách. Přestože jsou stejného typu, mohou se v měření objevovat výchyly.

Výsledky



Obrázek ii Screenshoty displejů aplikací pro opakované měření čtyř různých koncentrací (60,100,140, 180 mg/dl) při použití nových pelet.

Při výměně pelet se výsledky naměřené glykémie liší. Jednotky mg/dl jsou uváděny na zahraničních glukometrech, přičemž platí vztah:

$$18 \frac{mg}{dl} = 1 mmol/l. \quad (i)$$

Z obrázku lze také vidět, že se stoupající koncentrací glukózy vzorku roste i odchylka od referenční hodnoty.

Závěr

V této práci byl demonstrován opakovaně použitelný glukometr na bázi smartphonu, který se skládá z chytrého pouzdra na smartphony, vyrobeného na míru. Byl zde představen princip inovativní

metody pomocí enzymatických pelet. Odchylka převážně roste se stoupajícími hodnotami glukózy, ale v hladině glykémie jsou odchylky v normě. Také dochází k menším odchylkám v důsledku výměny enzymatických pelet. Tyto nedostatky by se daly částečně odstranit stanovením průměrné odchylky z kvantitativních měření glukózy.

TLC chromatografie acylglycerolů

[18] Originální název: ESPERÓN-ROJAS, Alaina A., Cristóbal TORRES-PALACIOS, Dalia SANTOS-LUNA, R. BAEZA-JIMÉNEZ, Cynthia CANO-SARMIENTO a Hugo S. GARCÍA. *A Specific Thin Layer Chromatography Method for the Identification and Separation of Medium Chain Acylglycerols*. *Journal of Oleo Science* [online]. 2018, **67**(11), 1397-1403 [cit. 2020-12-20]. ISSN 1345-8957. DOI: 10.5650/jos.ess18081.

Český název: Specifická metoda chromatografie na tenké vrstvě pro identifikaci a separaci acylglycerolů se středním řetězcem

Úvod

Mastné kyseliny se středním řetězcem jsou velice důležité pro zdravý chod živého organismu. Tyto sloučeniny obsahují 6 až 14 uhlíků a mají význam jak v lékařství, tak ale i v potravinářském průmyslu. Metoda TLC (Chromatografie na tenké vrstvě) představuje v dnešní době základní nástroj analytické chemie a používá se k identifikaci nejen u lipidů. TLC má mnoho výhod. Je to rychlá, jednoduchá, nenákladná metoda. V této práci jsou rozebrány 4 metody (A, B, C, D) a vzájemně porovnány jejich parametry a výsledky.

Metodika

Jak již bylo zmíněno v úvodu, v práci byly použity 4 metody chromatografie acylglycerolů. Chromatografie na tenké vrstvě je založena na rozdělení jednotlivých látek mezi postupující mobilní (pohyblivou) fází a stacionární (pevnou) fází tenké vrstvy. K jednotlivým metodám bylo použito mnoho chemických směsí, jejichž přesné složení je uvedeno v práci.

Metoda A

Jako první metoda byla použita kvantitativní separace monoacylglycerolů, diacylglycerolů a triacylglycerolů na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie. Provedení bylo časově velice náročné. Mobilní fází zde tvořila diethylether s acetonem s objemovým poměrem 92:8. Vývojovým činidlem byl 70% vodný roztok kyseliny sírové nasycený oxidem chromitým.

Metoda B

Princip této metody byl založen na použití dvou po sobě jdoucích mobilních fází (rozpuštědel). První mobilní fází tvořil diethylether, diethyl a kyselina octová (10:10:0,4), druhou fází zase ropný ether a diethylether (49:1). Byla tak provedena vizualizace třídy lipidů.

Metoda C

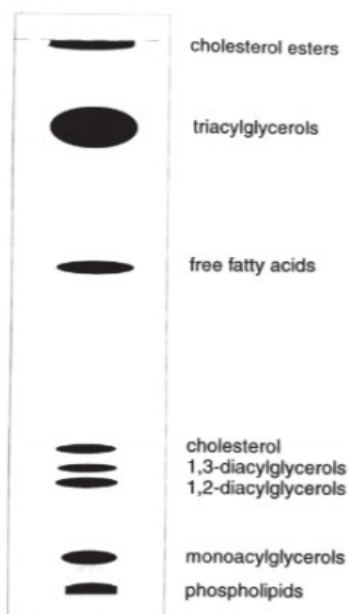
V této metodě sestávala mobilní fáze z hexanu, diethyletheru a kyseliny octové (80:20:2). Díky metodě byla většina jednoduchých lipidů oddělena, zatímco fosfolipidy a další polární lipidy zůstaly v původním stavu. Steroly vytvořili fialovou skvrnu. Rozdělení jednotlivých vrstev je zobrazeno na další straně na Obrázek iii.

Metoda D

Poslední metoda byla provedena pomocí mobilní fáze tvořené hexanem a acetonem (70:30). Na rozdíl od předchozích metod zde byla jedna mobilní fáze, ale dvě vývojová činidla.

Výsledky

Vzhledem k tomu, že TLC analýza je efektivní a široce používaná metoda, stále se vyvíjí nové a nové kombinace mobilních fází a rozpouštědel zvyšující její citlivost. Cílem této studie bylo dosáhnout rozložení jednotlivých tříd lipidů s co největší citlivostí a přesností.

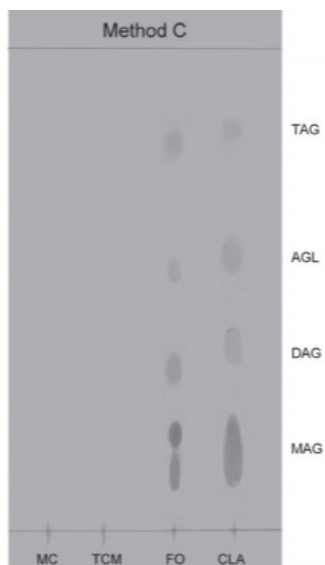


Obrázek iii Schématické zobrazení TLC separace jednoduchých lipidů na tenké vrstvě silikagelu. Mobilní fáze pro uvedenou TLC separaci je tvořena kyselinou hexandiethylether-mravenčí.

Metoda A nebyla příliš vhodná. Vysoká koncentrace kyseliny sírové způsobila společně s ohřevem, že část oxidu křemičitého z křemičité desky, na které byla metoda prováděna, byla promyta a v materiálu se objevily bubliny. Proto metoda nemůže být opakována a identifikace skvrn byla částečně zkreslena. Metoda by mohla být využívána jako velmi obecná, jelikož má sníženou citlivost.

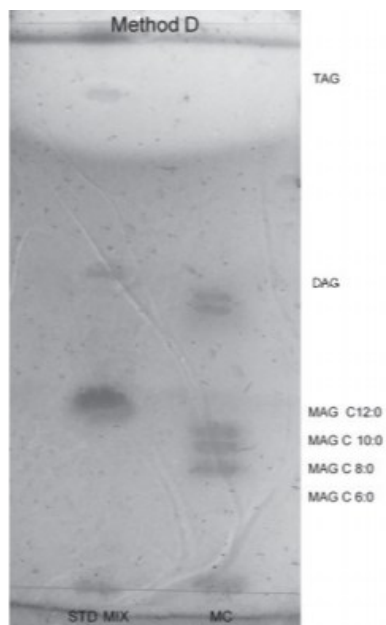
Autoři **metody B** založili svou metodiku na neutrální lipidové separaci kvasinek. K vizualizaci separačních tříd musí být využito zuhelnatění pomocí MnCl_2 (chloridu manganatého). Přestože je metoda poměrně citlivější než metoda A, nelze specifikovat typy lipidů přítomných v extraktu. Nelze tedy určit, zda jsou nasycené, nenasycené a určit velikost jejich uhlíkového řetězce.

U **metody C** bylo těžké jednoznačně oddělit skvrny tříd, jelikož nebyly příliš viditelné. Účinnost a citlivost metody závisí na povaze přítomné aminokyseliny. Proto je jednoduché touto metodou identifikovat acylglyceroly s dlouhým řetězcem nenasycených mastných kyselin, k identifikaci středních a nasycených řetězců mastných kyselin není metoda dostatečně citlivá.



Obrázek iv Rozložení tříd látek pomocí metody C. Na ose x jsou zkoumané vzorky, na pomyslné ose y je rozložení tříd, kdy TAG jsou triacylglyceroly, AGL jsou acylglyceroly, DAG jsou diacylglyceroly a MAG jsou monoacylglyceroly.

Z těchto důvodů je nutné stále vyvíjet citlivější metody. V práci jsou uvedeny další možnosti mobilních fází, které by mohli být citlivější k identifikaci. Jednou z možností je např. hexan s acetonem (70:30). Tato mobilní fáze byla zkoumána jako **metoda D**.



Obrázek v Rozložení tříd látek pomocí metody D. Na ose x jsou zkoumané vzorky, na pomyslné ose y je rozložení tříd, kdy TAG jsou triacylglyceroly, DAG jsou diacylglyceroly a MAG jsou monoacylglyceroly s určitou koncentrací.

Závěr

TLC je významná technika v oblasti analýzy lipidů. Přestože však existuje mnoho metod separací a vizualizací sledovaných sloučenin, není vyvinuta dostatečně citlivá metoda pro identifikaci nasycených lipidů se středním řetězcem (6–10 uhlíků). V práci jsou popsány tři metody, které byly hodnoceny z hlediska analýzy acylglycerolů. Nedosáhlo se však dostatečné citlivosti pro správnou vizualizaci a oddělení požadovaných sloučenin. Proto byla ve studii uvedena poslední metoda, která byla vyhodnocena jako nejcitlivější a ta sestávala z mobilní fáze hexanu a acetonu.

Optický spektrometr na smartphonu pro měření hemoglobinu

[19] Originální název: EDWARDS, P., ZHANG, C., ZHANG, B. *Smartphone based optical spectrometer for diffusive reflectance spectroscopic measurement of hemoglobin* [online]. *Sci Rep* 7, 12224 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-12482-5.

Český název: Optický spektrofotometr založený na platformě smartphonu pro difuzně odrazové spektroskopické měření hemoglobinu

Úvod

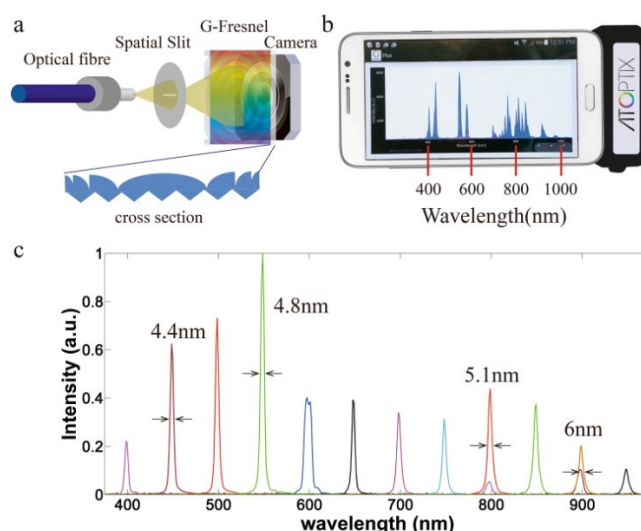
Studie uvádí miniaturní spektrofotometr G-Fresnel pracující v režimu viditelného a blízkého infračerveného pásma. Spektrometr obsahuje kompletní spektrografický systém včetně detekčního hardwaru a je připojován k zařízení smartphonu pomocí microUSB portu. Je schopen dosáhnout rozlišení asi 5 nm v rozsahu vlnových délek od 400 nm do 1000 nm. V práci je rozebrán vývoj difuzní odrazové spektroskopie pomocí spektrometru pro chytré telefony a zároveň je demonstrována schopnost měření hemoglobinu. V současné době je pro diagnostiku karcinomů využívána nejčastěji invazivní a nákladná metoda biopsie, proto je snaha o vývoj přenosného, neinvazivního, efektivního a spektrometrického zařízení důležitá. V posledních letech roste zájem o vývoj přenosných, levných, spektroskopických zařízení a jejich integraci do mobilních telefonů, aby se usnadnil přístup a zpracování dat pomocí mobilní výpočetní technologie.

Metodika

Celkovou koncentraci hemoglobinu lze určit neinvazivním měření oxy-hemoglobinu a deoxy-hemoglobinu ve tkáni. V praxi se tento princip využívá pro detekci karcinomu. Difúzní reflexní spektroskopie (DRS) je kvalitní metoda měření hemoglobinu v tkáni. Světlo DRS proniká hluboko do tkáně a znovu se vynořuje na povrch až poté, co podstoupí interakce s tkáněmi. Jedná se o absorpci chromoforů a vícenásobné rozptyly mezi buněčnými a mezibuněčnými strukturami. Proto spektrum DRS obsahuje důležité informace o koncentracích chromoforů a vlastnostech rozptylu tkáně. Ve viditelné vlnové délce jsou nejvýznamnějšími absorbéry v lidské tkáni oxy-hemoglobin a deoxy-hemoglobin.

Pro implementaci miniaturizovaných optických spektrometrů s vysokým rozlišením byl vyvinut G-Fresnel, difrakční optický prvek s dvojí funkcí (zaostřování a rozptyl). Transmise G-Fresnel, jak se používá v této práci, sestává z Fresnelova čočkového vzoru, na jedné straně pro zaostření nebo kolimaci dopadajícího světla, a mřížkového vzoru, na druhé straně pro rozptýlení různých základních vlnových délek.

Spektrometr pro smartphony byl nedávno předveden přímým umístěním G-Fresnela před vestavěnou kameru smartphonu. Byla také studována aplikace koncentrace proteinu na Bradfordův test. Jelikož pozice zadní kamery se u různých smartphonů liší (problémy se zarovnáním spektrálních obrazů), byl v této práci vyvinut spektrometr G-Fresnel, který obsahuje kompletní spektrografický systém, včetně detekčního hardwaru a řídicí elektroniky.



Obrázek vi (a) Schéma G-Fresnelova spektrometru. Příchozí vlákno (optical fibre) dodává světelný signál na štěrbinu (spatial slit). Přenosové zařízení G-Fresnel, obsahující mřížkový vzor na jedné straně (600 čar/mm) a vzor Fresnelovy čočky na druhé straně. Oba kolimují světlo vyzařované ze štěrbinu a rozptylují různé vlnové délky napříč mobilním kamerovým systémem obsahujícím zabudovanou čočku, která zaostřuje rozptýlené světlo na doplňkový obrazový snímač (CMOS). (b) Spektrofotometr připojený ke smartphonu, který zobrazuje měřené spektrum. (c) Naměřené spektrum laditelného úzkopásmového kalibračního zdroje ukazující rozlišení vlnové délky (osa y) na několika reprezentativních vlnových délkách (osa x).

Snímky surového Bayerova vzoru (RGB model) zachycené detektorem CMOS jsou nejprve převedeny na dvourozměrný spektrální obraz na úrovni šedé sečtením hodnot červené, zelené a modré pixely. Spektrální obrazy úrovně šedé jsou poté sečteny sloupcem (ve směru štěrbinu), aby se získala konečná jednorozměrná spektrální data. Řídící elektronika zařízení je implementována tak, aby se spektrometr mohl připojit ke smartphonu pomocí nabíjecího portu microUSB. Aplikace pro systém Android je vyvinuta pro konfiguraci a ovládání spektrometru, ale také pro přenos spektrálních dat do telefonu a pro analýzu. Aplikace umožňuje uživateli nastavit čas integrace, zahájit měření, uložit naměřená data, zobrazit spektra a provést jednoduchou analýzu výsledků.

V práci bylo pro srovnání využito 16 fantomů (vzorky kapalné tkáně) a pro srovnání byl využit stolní spektrometr. K měření spektra byla vláknová sonda G-Fresnel spektrometru přiložena k povrchu fantomů a došlo tak k měření individuálního spektra jednotlivých fantomů. Po všech měřeních byl hrot sondy uveden do kontaktu se standardem odrazivosti, který má plochu odrazivosti napříč všemi vlnovými délkami. Vlnová délka u měření G-Fresnel spektrometrem se zvyšovala v kroku 50 nm. Na každé vlnové délce bylo spektrum zdroje kalibrace zachyceno pomocí chytrého spektrometru.

Výsledky

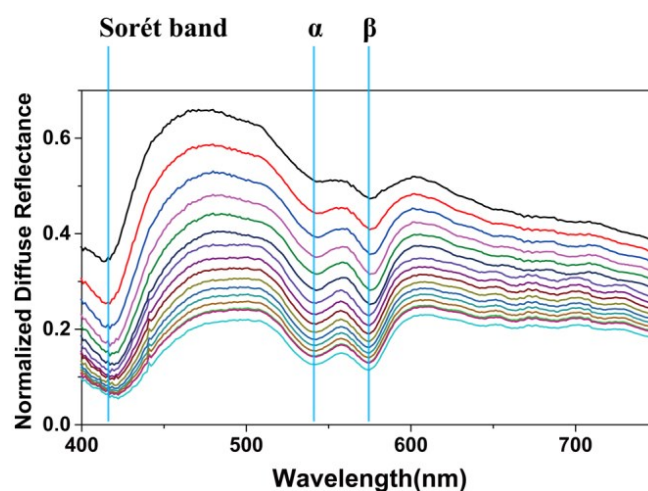
Fantomové vzorky kapalné tkáně jsou směsí lidského hemoglobinu jako absorbéru a polystyrenových mikrosfér jako rozptylovače ve vodě. Polystyrenové mikrokuličky se používají ke simulaci rozptylu tkáně. Hemoglobin, jako jediný absorbér v tomto vzorku, určuje absorpci vzorku. V práci bylo připraveno 16 fantomů, které pokrývají rozsah koncentrace hemoglobinu od 5,39–36,16 μM ve vodě. V práci muselo být zohledněno okolní světlo odečtením od měřené difuzní odrazivosti a referenčních spekter.

Ke studii fantomů musely být předem vypočítány dva klíčové parametry pro DRS, absorpce a snížený koeficient rozptylu. Koeficient absorpce ($\mu_a(\lambda)$) byl stanoven pomocí spektrofotometru

měřením zředěného zásobního roztoku hemoglobinu. Snížené koeficienty rozptylu ($\mu_s'(\lambda)$) byly vypočítány pomocí velikosti, hustoty a indexu lomu rozptylů. Koncentrace fantomového hemoglobinu a očekávané hodnoty μ_a s μ_s' v rozsahu vlnových délek 430–630 nm jsou uvedeny níže na Obrázek vii.

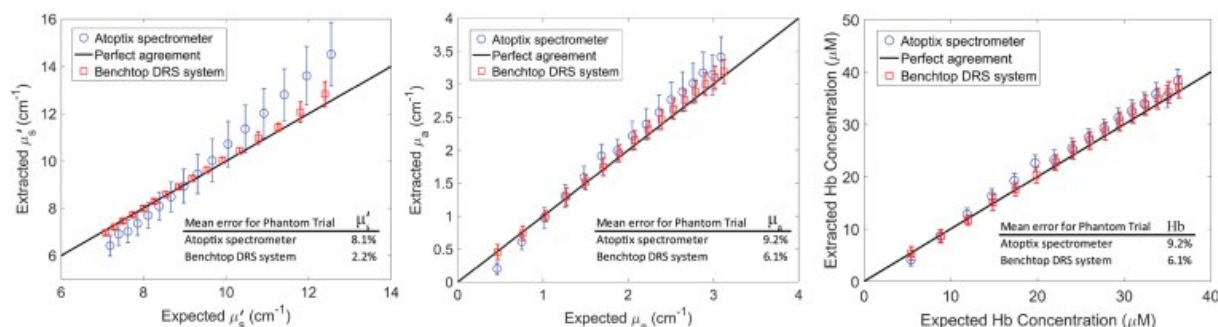
Phantom	Hb concentration (μM)	Expected μ_a (cm^{-1})	Expected μ_s' (cm^{-1})
1	5.39	0.46	12.55
2	8.80	0.75	11.95
3	11.90	1.02	11.41
4	14.74	1.26	10.92
5	17.34	1.48	10.46
6	19.73	1.69	10.05
7	21.94	1.87	9.66
8	23.98	2.05	9.31
9	25.89	2.21	8.98
10	27.66	2.36	8.67
11	29.31	2.50	8.38
12	30.86	2.64	8.11
13	32.31	2.76	7.86
14	33.67	2.88	7.62
15	34.95	2.99	7.40
16	36.16	3.09	7.19

Obrázek vii Shrnutí očekávaných koncentrací hemoglobinu, stejně jako průměrné absorpční a rozptylové koeficienty (průměrně přes 430–630 nm) 16 fantomů.



Obrázek viii Spektrum difuzní odrazivosti 16 fantomů. V obrázku jsou vidět 3 hlavní absorpční pásy (Sorét α a β pásy) oxyhemoglobinu. Měřená odrazivost (osa y) na absorpčních vrcholech klesá s rostoucí koncentrací hemoglobinu, jak se očekávalo.

K porovnání stolního spektrometru a chytrého spektrometru byl použit inverzní model Monte Carlo a byly získány jak absorpční, tak redukované rozptylové koeficienty z dat spektra difúzní odrazivosti.



Obrazek ix Porovnání chyb stolního a chytrého spektrometru u měření jednotlivých parametrů. Byly získány výsledky vyhledávání s průměrnými chybami 9,2 % a 8,1 % pro absorpci a snížené koeficienty rozptylu u chytrého spektrometru. U stolního spektrometru byly získány výsledky vyhledávání s průměrnými chybami 6,1 % a 2,2 % pro absorpci a snížené koeficienty rozptylu.

Závěr

V práci byl vyvinut spektrometr G-Fresnel, který obsahuje kompletní spektrografický systém, včetně detekčního hardwaru a řídicí elektroniky. Dále byl vyvinut systém DRS založený na tomto chytrém spektrometru a pomocí studie tkáňových fantomů bylo demonstrováno kvantitativní měření koncentrace hemoglobinu a snížený koeficient rozptylu. Důkaz koncepčních studií tkáňových fantomů (klamných jevů) přinesl průměrnou chybu 9,2 % při měření koncentrace hemoglobinu, což je srovnatelná chyba s chybou komerčního stolního spektrofotometru (jehož chyby se pohybují v rozsahu 5–10 %). Spektrometr G-Fresnel pro smartphony a systém difúzní odrazivé spektroskopie umožňují nové příležitosti v oblasti péče, jako je např. screening rakoviny.

Přímý screening aktivity enzymů pomocí elektrosprejové ionizace

[20] Originální název: NAZARI, Milad, Måns EKELÖF, Sitora KHODJANIYAZOVA, Nathaniel L. ELSEEN, Jon D. WILLIAMS a David C. MUDDIMAN. *Direct screening of enzyme activity using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization. Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2017, 31(22), 1868-1874 [cit. 2020-12-20]. ISSN 09514198. DOI:10.1002/rcm.7971.

Český název: Přímý screening aktivity enzymů metodou elektrosprejové ionizace¹ pomocí infračerveného maticového laseru a principu laserové desorpce

Úvod

Vysoce výkonný screening (HTS) je zásadním krokem v procesu objevování léků. Většina metod HTS založených na hmotnostní spektrometrii (MS), před analýzou však vyžaduje kroky čištění vzorku. V této práci je prezentována užitečnost infračerveného maticového laseru v metodě desorpční elektrosprejové ionizace (IR-MALDESI) pro monitorování enzymatické reakce přímo z biologického pufrovacího systému bez čištění vzorku a s vysokou propustností. Tato práce slouží jako studie konceptu pro demonstraci užitečnosti IR-MALDESI pro aplikace HTS.

Některé z nejdůležitějších detekčních metod v aplikacích HTS jsou optické testy, které se při detekci spoléhají na UV nebo fluorescenční spektroskopii. Metody založené na hmotnostní spektrometrii jsou objevujícím se technologickým pokrokem pro aplikaci na HTS testy. Nedávný vývoj v odběru vzorků a ionizaci u vysoce výkonných MS zahrnuje desorpční elektrosprejovou ionizaci (DESI). Tyto velmi odlišné metody sdílejí důležitou vlastnost rychlého, prostorově rozlišeného odběru vzorků v kombinaci s velmi vysokou tolerancí pro energeticky nezávislé znečištění.

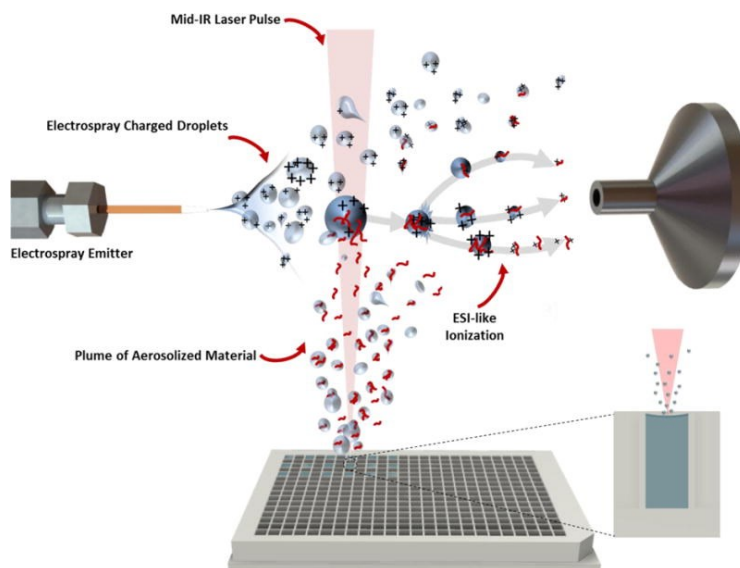
Metodika

Maticová laserová desorpční ionizace elektrosprejem (MALDESI) je metoda ionizace prostředí kombinující vlastnosti laserové desorpce, ionizace podporované maticí (MALDI) a elektrosprejové ionizace (ESI). V MALDESI analýzách se laser používá k desorpci materiálu z povrchu vzorku. Obláček ablatovaného materiálu se rozdělí v nabitých kapičkách ortogonálně orientovaného elektrosprejového oblaku, kde se ionty generují způsobem podobným ESI. Díky vzorkovací frekvenci omezené hlavně pracovním cyklem hmotnostního analyzátoru může IR-MALDESI dosáhnout analytických časů kratších než jedna sekunda na vzorek, takže je neodmyslitelně vhodný pro aplikace HTS.

Typicky se k aerosolizaci materiálu používají dva laserové výstřely, kde se generované ionty z obou pulzů ukládají do C-pasti na pevnou dobu akumulace (75 ms) a následně se vstříkují do detektorů pro měření hmotnosti. Celý proces analýzy vzorku pomocí 2 laserových pulzů trvá méně než jednu sekundu, Zdroj IR-MALDESI je spojen s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišovacím výkonem (RP) a většina analýz se provádí při nominálních RP 140 000. Protože většina experimentů HTS se provádí částečně zacíleným způsobem, lze celkovou dobu analýzy zkrátit provedením experimentů s nižšími rozlišovacími schopnostmi. V práci byla aplikována HTS analýza pomocí IR-MALDESI sledování enzymatické aktivity isocitrát dehydrogenázy 1 (IDH1) přímo z jamek destičky obsahujících reagující pufr.

¹ Elektrosprejová ionizace (ESI) je ionizační technika v hmotnostní spektrometrii, která k tvorbě iontů využívá elektrosprej, ve kterém je na kapalinu aplikováno vysoké elektrické napětí, čímž se vytvoří aerosol.

Reakce pufrů byly zahájeny promícháním stejných částí roztoků obsahujících substráty a enzym (přesné složení roztoků naleznete v probírané práci). Samotné analýzy IR-MALDESI byly provedeny takto: Destičky s jamkami obsahující vzorky byly umístěny na X-Y polohovací stupeň a upraveny tak, aby byly kapalně povrchy jamek umístěny 5 mm pod vstup hmotnostního spektrometru. K aerosolizaci materiálu ze vzorku v každé jamce byl použit mid-IR laser vyladěný na 2940 nm. Povrch aerosolizovaného materiálu byl ionizován prostřednictvím interakcí s ortogonálním elektrosprejem.



Obrázek x Schéma zdroje IR-MALDESI upravené pro přímou analýzu vzorků z jamek destiček. Zvětšená oblast ukazuje boční pohled na destičku jamky obsahující roztok.

IR-MALDESI byl použit k přímé analýze reakčních směsí z jamkové destičky v různých časových bodech po zahájení reakce. Procentuální přeměna prekurzorů na produkty byla použita k testování enzymové aktivity. Reakce byla prováděna se dvěma různými koncentracemi prekurzorů a enzymu, aby se posoudil dynamický rozsah testu. Nakonec byla navržena studie pseudo-HTS, aby se prozkoumala užitečnost aktivity enzymu pomocí metody IR-MALDESI vysoce výkonným způsobem.

Za účelem prokázání užitečnosti IR-MALDESI byl navržen experiment pseudo-HTS, kde bylo analyzováno 10 různých jamek HTS způsobem. Tento experiment byl proveden jednoduchým slepým způsobem, kdy jeden ze spoluautorů této práce připravil 10 různých roztoků a pipetoval je do jamek destičky. Každá jamka byla analyzována pomocí metody, kde byly střídavě měřeny hmotnostní spektrometrické oblasti při nominálním RP 70 000. K měření každého rozsahu (hmotnostní spektrometrie) byly použity dva laserové záběry a integrační doba byla nastavena na 75 ms pro každé skenování. Prvních 14 skenů bylo použito k výpočtu procentní přeměny isocitrátu (přeměna na α -KG a na NADP⁺/NADPH), aby bylo možné předpovědět obsah každé jamky.

Výsledky

Přeměna v procentech pro produkty byla vypočítána pomocí rovnice:

$$\text{konverze } [\%] = \frac{I_{\text{produkt}}}{I_{\text{produkt}} + I_{\text{výchozí látka}}}, \quad (\text{ii})$$

kde I_x je množství iontů sledovaného analytu a konverze (přeměna) je uváděna v procentech. Procento konverze je spolehlivějším měřítkem aktivity enzymu než absolutní množství produktového iontu,

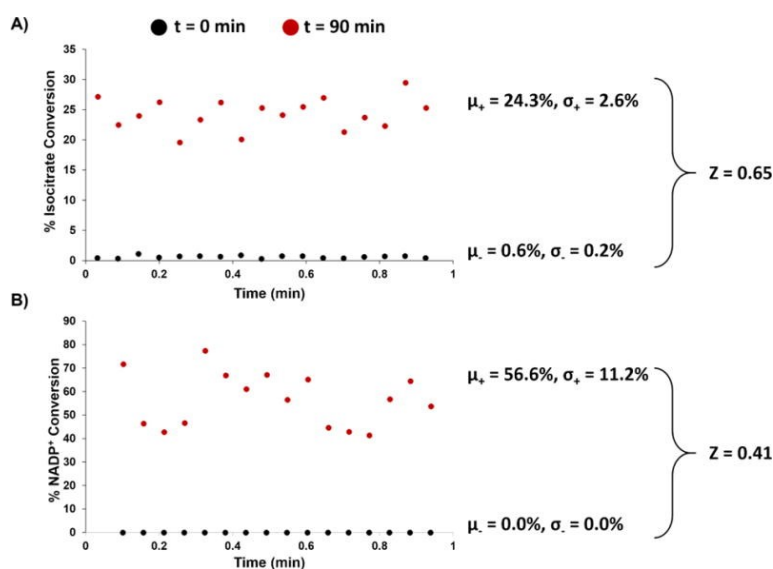
protože i když se množství iontů analytů liší od jednoho snímku k druhému kvůli variabilitě účinnosti vzorkování, poměr množství iontů zůstává konstantní.

Z hmotnostních spekter z úplných MS skenů v časových bodech 0 a 60 minut byl vypořizován pokles množství iontů výchozích látek a současné zvýšení množství iontů produktů. Pomocí množství iontů v odlišných časových bodech byly vypočítány procentuální přeměny isocitrátu v různých časových bodech. Jak se dalo očekávat, reakce probíhá rychleji ve vzorcích s větší koncentrací.

Výraznou výhodou IR-MALDESI pro HTS je jeho přímá kompatibilita s širokou škálou preparátů vzorků včetně nejčastěji používaných destiček. Jako měřítko kvality testu byl vypočítán Z-faktor potenciální obrazovky IR-MALDESI pomocí rovnice:

$$Z = 1 - \frac{3 \times \sigma_+ + 3 \times \sigma_-}{\mu_+ - \mu_-}, \quad (\text{iii})$$

kde σ je standardní odchylka a μ je průměr (znaménka + nebo – označují pozitivní a negativní odchylky). Z-faktor typicky spadá do rozsahu $-1 \leq Z \leq 1$, přičemž větší hodnoty indikují vyšší vhodnost testu pro HTS. Z-faktor pro IR-MALDESI přímý screening IDH1 lze vypočítat pomocí procenta konverzí výchozích látek v časových bodech nula a 90 minut, v uvedeném pořadí jako negativní a pozitivní odchylky. Vypočítaný Z-faktor pro procentuální konverzi isocitrátu na α -KG byl 0,65, zatímco Z-faktor pro procentní konverzi NADP+ na NADPH byl méně citlivý při 0,41. Společně tyto hodnoty ukazují schopnost metody oddělit zásahy od falešných poplachů s vysokou spolehlivostí.



Obrázek xi Vypočtená procentuální přeměna isocitrátu na α -KG (A) a NADP + na NADPH (B) měřená kontinuálně po dobu jedné minuty.

Závěr

IR-MALDESI systém byl schopen snadno monitorovat aktivitu IDH1 v čase při dvou různých koncentracích výchozích látek a enzymu. Vypočtené Z-faktory 0,65 a 0,41 potvrdily vhodnost vyvinuté metody pro screening aktivity enzymu HTS způsobem. V jednoduché analýze pseudo-HTS byl IR-MALDESI schopen předpovědět identitu jednotlivých vzorků, kde 8/10 vzorků bylo identifikováno s vysokou spolehlivostí a další dva byly identifikovány s nižší spolehlivostí. Enzymatická aktivita IDH1 byla skenována přímou analýzou obsahu reakce z pufru na destičkách jamek bez kroků čištění vzorku. Tato studie prokázala vysokou spolehlivost IR-MALDESI pro přímou analýzu enzymatických reakcí z biologických pufrů bez čištění vzorku a její obrovský potenciál pro aplikace HTS.

Sample #	α -KG % Conversion	NADPH % Conversion	Predicted Sample Identity	Correct Sample Identity
1	N/A	N/A	Blank	Blank
2	2.93	31.3	Reaction	Reaction
3	1.58	0	Substrate Only	Substrates Only
4	N/A	N/A	Blank	Blank
5	N/A	0	Blank	Blank
6	2.29	24.3	Reaction	Reaction
7	0	0	Substrates Only	Substrates Only
8	2.59	30.1	Reaction	Reaction
9	2.18	4.77	Reaction	Reaction *
10	N/A	N/A	Blank	Blank

Obrázek xii Výsledky studie pseudo-HTS. Zelená barva označuje zvolenou identitu vzorku (predicted sample identity) s vysokou spolehlivostí, oranžová označuje zvolenou identitu jednotlivých vzorků (sample) s menší spolehlivostí. IR-MALDESI dokázala s vysokou spolehlivostí předpovědět identitu u 8/10 vzorků. Dále lze vyčíslit procentuální zastoupení jednotlivých látek po konverzi vzorku (N/A značí nedostupnou variantu). Také lze zjistit správnou identifikaci vzorku (correct sample identity).

Teoretická část

1 Úvod do biochemie

Slovo chemie pochází z řeckého slova „*chemi*“, v překladu černá země. Tak se v dávném starověku říkalo území Egypta. Je to vědní obor, který se zabývá poznáním, ovládnutím a využitím zákonitostí, kterými se řídí přírodní děje a metabolismy živých i neživých látek. Chemii jako takovou dělíme na anorganickou, analytickou a organickou. Dále existují další odvětví chemie, která jsou od těchto tří odvozená. Tato práce se zabývá biochemií, která vychází ze znalostí organické chemie. Ta se zabývá především přeměnami sloučenin vodíku, uhlíku a dalších důležitých prvků. Na rozdíl od anorganické chemie se zabývá výzkumem živých organismů, organických sloučenin. Ty se totiž značně liší stavbou a vlastnostmi od minerálů a dalších látek z neživé, anorganické přírody. Organické látky jsou citlivější k vyšším teplotám. Většinou se dají bez tuhého zbytku spálit, přičemž mezi spaliny najdeme převážně vodu a oxid uhličitý [2].

Chemie se obecně dělí do několika oborů – analytická chemie, biochemie, anorganická chemie, organická chemie a fyzikální chemie. V této bakalářské práci se budeme zabývat pouze aplikací biochemie v medicíně, tedy klinickou biochemií [21].

1.1 Vývoj biochemie

Odvětví biochemie bylo často označováno jako „fyzilogická chemie“. Samotný termín „biochemie“ vytvořil Carl Alexander Neuberg v roce 1903. Slovo je opět řeckého původu. Skládá se z termínu „*bios*“ neboli život a „*chymos*“ neboli džus. Již ve starověku vznikaly první záznamy o identifikaci metabolických a genetických nemocí. 400 př. n. l. indický lékař Charaka potvrdil, že změnami metabolismu sacharidů a tuků vzniká dnes nazývaná cukrovka. Jedním z prvních dokumentů o biochemii byla „Kniha o Organické chemii a její aplikace ve fyziologii a patologii“. Publikována byla v roce 1842 Justem Von Liebigem, který v ní představil koncepty metabolismů [1].

Přestože veliký rozvoj biochemie nastal až ve 20. století, mnoho historických milníků v daném oboru vzniklo dávno předtím. Níže je uvedeno několik podstatných událostí pro obor biochemie.

1773 Dokázal Hilaire Rouelle izolovat močovinu ze vzorku moči.

1828 Německý chemik Friedrich Wöhler dokázal z anorganických látek syntetizovat organickou močovinu.

Byl to důležitý důkaz spojení živé a neživé přírody, jsou tvořeny stejnými prvky.

1865 Popsal Gregor Mendel základní zákony klasické genetiky.

1897 Eduard a Hanz Buchnerovi extrahovali první enzymy ze sloučenin a pomocí extraktu kvasinek prokázali fermentaci² cukrů [2].

1902 Emil Hermann Fischer provedl syntézu cukrů a purinů³. Pan Fischer je zobrazen na následující straně na Obrázek 1.1 [11].

Jak již bylo zmíněno výše v této kapitole, největší vývoj biochemie nastal ve 20. století. Byly odhaleny struktury, funkce a zákony biopolymerů⁴. Byly definovány základní systémy metabolismů. K bouřlivému rozvoji došlo převážně díky novým zavedeným technikám výzkumu. Začala se využívat

² Kvašení látek neboli fermentace je proces, při kterém vznikají energeticky chudší látky [2].

³ Purin je dusíkatá heterocyklická sloučenina důležitá pro tvorbu nukleových kyselin [11].

⁴ Biopolymery jsou biologické makromolekuly vzniklé složením nízkomolekulárních látek [3].

chromatografie, elektroforéza, mikroskopie, hmotnostní spektrometrie, spektrofotometrie a genová technologie [11].



Obrázek 1.1 Fotografie německého chemika Emila Hermanna Fischera žijícího v letech 1852–1919. Pan Fischer byl nositelem Nobelovy ceny. Je považován za zakladatele moderní lékařské chemie [11].

Biochemie se stala téměř nejrychleji se rozvíjejícím oborem v medicíně. Nástroje pro výzkum ve všech odvětvích lékařské vědy jsou založeny na základních principech biochemie. Studium biochemie je zásadní pro pochopení základů funkce těla. Získáváme informace o fungování buněk na molekulární úrovni. Biochemie také umožnila realizovat velké pokroky v genomice⁵. Moderní lékařská praxe je velmi závislá na laboratorní analýze tělních tekutin, zejména pak krve a moči. Projevy různých nemocí se odrážejí v jejich složení. Studium vymezení normálních a abnormálních složek těla se zabývá obor klinické biochemie. Kromě klinické biochemie známe i další odvětví biochemie, např. potravinářskou biochemii, nebo xenobiochemii zabývající se cizími látkami v organismu. Těmi se v této práci však zabývat nebudeme [1].

1.2 Biochemie

Biochemii lze definovat jako vědu, která se na molekulární úrovni zabývá studiem živých organismů. Biochemii řadíme do skupiny přírodních věd, stejně jako matematiku, fyziku, chemii a biologii. Všechny tyto přírodní vědy jsou vzájemně propojeny. Biochemie se vyvinula z organické chemie. Popis biologicky významných molekul a jejich vzájemných metabolismů se odvíjí od organické biochemie. Fyziku zde využíváme např. při definici nábojových vlastností aminokyselin, při rozboru energetického zbarvení různých bioprosesů, při zkoumání enzymové kinetiky a v dalších procesech spojených s měřením termodynamických veličin. K vyhodnocení biochemických procesů je využívána matematická statistika. Biochemie je tedy interdisciplinární obor, který využívá znalostí chemie a fyziky ke zjednodušení zkoumání biologických procesů a metabolismů [2].

Biochemii, jakožto obor zabývající se poznáním živé přírody a hledáním podstaty života, lze dělit na popisnou a dynamickou biochemii. Popisná biochemie se zabývá složením, strukturou a vlastnostmi jednotlivých látek. Dynamická se naopak věnuje energetickým změnám probíhajícím v daných látkách [7].

Následující kapitoly se budou věnovat biochemii popisné. Ta tedy zkoumá složení látek, jejich specifickou strukturu a jednotlivé vlastnosti. Obecně se zabývá látkovým složením živé hmoty, kde

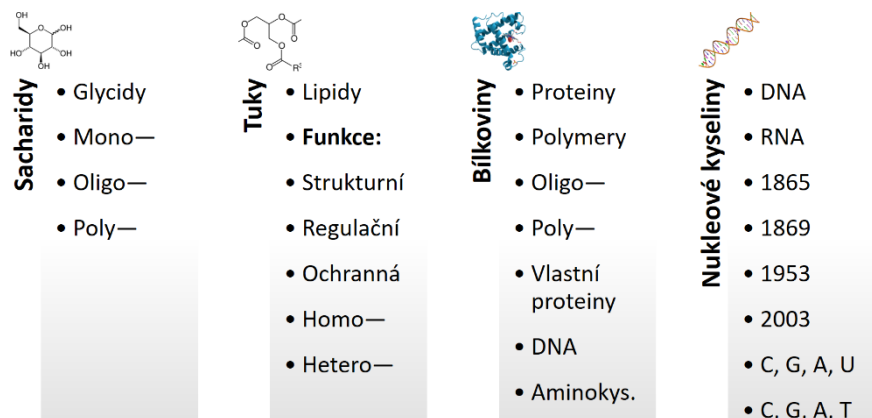
⁵ Genomika se zabývá studiem genomů různých organismů. Pomocí zkoumání kmenových buněk se otevírají nové výhledy v léčbě nemocí jako je rakovina a AIDS [2].

pojem živá hmota definuje soubor molekul a iontů. Živá hmota se skládá z biogenních prvků, ty tvoří biomolekuly a z biomolekul se skládají organické sloučeniny [8].

Biogenní prvky jsou prvky, které jsou nezbytné pro tvorbu živých buněk a organismů. Podle jejich obsahu v buňce je dělíme na *makrobiogenní prvky*, *oligobiogenní prvky*, *stopové prvky* a *škodlivé látky*. Mezi makrobiogenní prvky, které jsou nejvíce zastoupené v živých hmotách, řadíme: kyslík, uhlík, vodík, fosfor a vápník. Makrobiogenní prvky tvoří více než 1 % živé hmoty a jsou základními stavebními kameny organických hmot. Do skupiny oligobiogenních prvků, prvků o koncentraci 0,05 % až 1 % v živé hmotě, patří: síra, draslík, sodík, hořčík a chlor. Stopové prvky se v živých hmotách objevují v koncentraci menší než 0,05 %. Do stopových prvků zařazujeme např. železo, mangan, měď, zinek, kobalt, jód, křemík a fluor. Poslední skupinou jsou škodlivé látky, ty mohou živé hmoty poškodit. Patří sem rtuť, která způsobuje psychické výkyvy živého organismu a hromadí se v ledvinách, olovo nebo např. kadmium. Jedovaté jsou právě ty prvky, které jsou rozpustné v krvi. Nebezpečná je převážně inhalace jedu, jelikož je jeho vstřebávání do živých tkání účinnější než při jeho požití [8].

Biomolekuly jsou molekuly látek v živých systémech. Nejznámější a nejvíce zastoupenou biomolekulou v lidském těle je voda. Je to základní biomolekula pro všechny živé organismy, kde není voda, tam nemůže být život. Biogenní prvky a biomolekuly tvoří složitější biopolymery neboli organické sloučeniny. V oboru biochemie dělíme tyto biopolymery na **sacharidy**, **lipidy**, **aminokyseliny**, **přírodní látky** a **nukleové kyseliny**. Aminokyseliny dále tvoří struktury **proteinů** a **peptidů** [10].

Předmětem studia biochemie je tedy struktura a funkce základních stavebních kamenů živé hmoty (např. sacharidy, tuky, bílkoviny, nukleové kyseliny a další biomolekuly) – nejdůležitější organické látky, viz Obrázek 1.2 [21].



Obrázek 1.2 Schéma rozdělení nejdůležitějších organických látek v biochemii a výpis k nim významných bodů. Sacharidy, správným názvem označované jako glycidy dělíme dle počtu monosacharidových jednotek na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Tuky neboli lipidy mají tři hlavní funkce pro živé organismy a dělíme je na jednoduché homolipidy a složené heterolipidy. Bílkoviny, odborně proteiny, jsou polymery aminokyselin. Tvoří řetězce mnoha dalších sloučenin. DNA a RNA jsou nejvýznamnější nukleové kyseliny. Uvedené roky jsou významné pro výzkum nukleových kyselin a budou podrobněji rozebrány níže v kapitole. Poslední dva body označují DNA a RNA báze. Obrázek pochází z vlastního zdroje.

Níže se budeme věnovat velmi stručnému popisu jednotlivých organických látek, které jsou základem každé živé hmoty. Detailnější popis a rozbor organických látek je uveden v Dodatek B. Sacharidy, Dodatek C. Lipidy, Dodatek D. Aminokyseliny, Dodatek E. Další přírodní látky a Dodatek F. Nukleové kyseliny.

1.2.1 Sacharidy

Již první nesrovnalost u sacharidů je u samotného názvu. Jediným odborně správným synonymem pro sacharidy je pouze termín glycidy. V češtině se ovšem v běžném jazyce velice často (či dokonce převážně) setkáváme s pojmem cukry, používaným jako synonymum ke glycidům. Ten ovšem není přesný. Za cukry považujeme jen sladce chutnající sacharidy, které jsou navíc zcela rozpustné ve vodě. Řadíme tak mezi ně pouze monosacharidy a několik disacharidů. Kapitola čerpá ze zdrojů: [1], [5], [9] a [21].

Sacharidy patří k základním látkám jak v těle rostlin, tak v organismech živočichů. Primárně dochází ke vzniku sacharidů při fotosyntéze rostlin. Živočichové jsou potom závislí na jejich přijímání v potravě, člověk umí některé z nich vyrábět rovněž uměle. Z hlediska výživy přitom sacharidy patří mezi tzv. makronutrienty, jelikož společně s proteiny a lipidy tvoří základní stavební kameny stravování. Funkce sacharidů v organismech jsou velice důležité. Jedná se o nejrychlejší zdroj energie (zejména pak glukóza a fruktóza), fungují jako zásobní látky (např. škrob, glykogen) a jsou součástí složitějších látek (hormonů, nukleových kyselin atd.). Některé sacharidy mají i stavební funkci, např. celulóza a chitin, které jsou však důležité převážně pro rostliny. V lidském těle jsou nevyužitelné.

Monosacharidy

Základními sacharidy jsou monosacharidy, které již nelze dále dělit. Jedná se tedy o základní stavební jednotku všech ostatních sacharidů. Z vědeckého hlediska dělíme glycidy:

- podle struktury na cyklické a nocyklické
- podle obsahu funkční skupiny na aldózy a ketózy
- dle počtu uhlíků na triózy, tetózy, pentózy, hexózy a vzácně i heptózy

Nejznámějšími monosacharidy jsou glukóza (hroznový cukr) a fruktóza (ovocný cukr). Monosacharidy jsou sice okamžitým zdrojem energie, na druhou stranu se ukládají do tukových zásob a dochází také k výkyvům koncentrace cukru v krvi. Musíme proto sledovat tzv. krevní glykémii, což je obsah cukru v krvi. U velkých výkyvů hladiny cukru se setkáváme s hypoglykemií (nedostatkem hladiny cukru) a hyperglykemií (přebytkem hladiny cukru). Významným onemocněním souvisejícím s hlídáním hladiny cukru, se kterým se v dnešní době setkává většina populace, je diabetes mellitus neboli cukrovka.

Oligosacharidy a polysacharidy

Další dvě skupiny, oligosacharidy a polysacharidy, se musí nejprve rozštěpit právě na monosacharidy a následně mohou být zdrojem energie. Na rozdíl od jednoduchých monosacharidů jsou to složité cukry. Oligosacharidy jsou tvořeny dvěma až deseti monosacharidovými jednotkami (odtud vychází názvy disacharidy, trisacharidy apod.). Nejdůležitějšími oligosacharidy jsou právě disacharidy, mezi které patří laktóza (mléčný cukr), maltóza (sladový cukr) a sacharóza (třtinový cukr).

Poslední skupinou jsou polysacharidy, které tvoří mnoho desítek až stovek monosacharidových jednotek. Jak vyplývá ze začátku textu, polysacharidy nemají sladkou chuť a jsou nerozpustné či velice špatně rozpustné ve vodě. Konkrétně se jedná o škrob, glykogen, chitin, celulózu (zřejmě nejrozšířenější organická látka na planetě Zemi) a mnoho dalších. Co se týče zdraví člověka, jsou právě

polysacharidy nejvhodnější ke konzumaci. Celý rozbor struktur, identifikace a klasifikace sacharidů je uveden v Dodatek B. Sacharidy.

1.2.2 Tuky

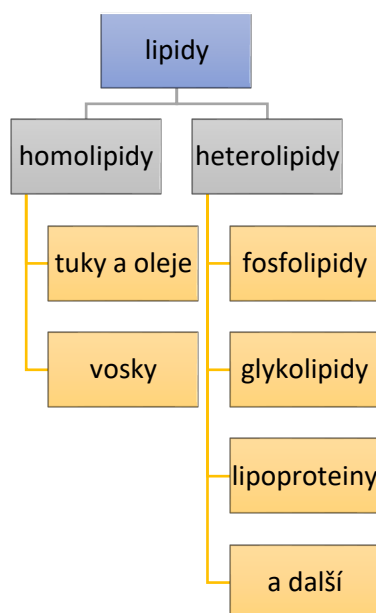
Pro lipidy se v češtině obecně užívá název tuky, prakticky to však není zcela přesné, neboť tuky jsou pouze jednou, přestože významnou podskupinou lipidů. Jedná se tedy o obdobný problém jako u sacharidů. Lipidy jsou organické sloučeniny *rostlinného*, *živočišného* nebo *mikrobiálního* původu. Podle původu se odlišuje jejich složitost a funkce. Tato kapitola čerpá ze zdrojů: [4], [5], [11], [21].

Lipidy jsou velice důležitou součástí správného fungování organismu. Jedná se konkrétně o funkce:

- **strukturní** (součást biologických membrán)
- **regulační** (steroidní hormony, vitaminy A, D, E a K atd.)
- **ochranná** (obal některých orgánů, např. ledvin)
- **tepelně izolační** (podkožní tuk)

Lipidy mohou zároveň fungovat jako rozpouštědla pro určité lipofilní látky.

Lipidy se skládají z esenciálních mastných kyselin, které tělo musí přijímat v potravě. Mastné kyseliny se dělí na *nasycené* (neobsahují dvojné vazby) a *nenasycené* (obsahují jednu či více dvojných vazeb). Lipidy dále dělíme na *homolipidy* a *heterolipidy*.



Obrázek 1.3 Schéma rozdělení lipidů. Zdroj vlastní.

Homolipidy neboli jednoduché lipidy, tvoří dvě podskupiny: *tuky a oleje*, což jsou estery vyšších karboxylových kyselin a trojmocného alkoholu glycerolu. Druhou skupinou jsou potom *wosky*, chemicky estery vyšších alifatických kyselin a alkoholů.

Druhou skupinou jsou tzv. **heterolipidy** neboli složené lipidy (někdy nazývané i lipoidy), u nichž se v molekule nalézá část nepatřící přímo k lipidům. Jedná se například o *fosfolipidy* obsahující kyselinu fosforečnou, *glykolipidy* obsahující sacharid a v neposlední řadě také *lipoproteiny* (proteiny

s navázanými lipidy), které jsou součástí krevní plazmy, cytoplazmy a buněčných membrán (také např. vaječného žloutku). Podskupin heterolipidů je mnoho, výše jsou uvedeny pouze ty nejdůležitější z nich. Celý rozbor struktur, identifikace a klasifikace lipidů je uveden v Dodatek C. Lipidy

1.2.3 Bílkoviny

Bílkoviny neboli odborně proteiny patří mezi organické sloučeniny, které jsou zásadně důležité pro všechny živé organismy. Z chemického hlediska se jedná o polymery složené nejméně ze dvou aminokyselin, jež jsou spojeny peptidovou vazbou. V podstatě známe 20 základních aminokyselin, ze kterých se bílkovinné řetězce v živých organismech skládají (proteinogenní): glycin, alanin, arginin, asparagin, kyselina asparagová, cystein, glutamin, kyselina glutamová, histidin, izoleucin, leucin, lysin, fenylalanin, methionin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin. Někdy se setkáváme i se selenocysteinem a pyrolysinem, ty jsou považovány za 21. a 22. proteinogenní aminokyselinu. Právě podle množství aminokyselin jsou proteiny děleny na **oligopeptidy** (2 až 10 aminokyselin), **polypeptidy** (11 až 100 aminokyselin) a do třetice **vlastní proteiny** (více než 100 aminokyselin). Celá kapitola čerpá ze zdrojů: [3], [4], [5], [14] a [21].

Aminokyseliny mají svou roli i při dalším členění bílkovin. K tzv. *jednoduchým proteinům* patří bílkoviny, které jsou složeny pouze z těchto svých základních látek (aminokyselin). U *složených proteinů* (glykoproteiny, nukleoproteiny, lipoproteidy, metaloproteiny nebo fosfoproteidy) jsou potom na aminokyseliny vázány i jiné substituenty. Bílkoviny jsou převážně kódovány v deoxyribonukleové kyselině (DNA) organismů.

Funkce proteinů:

- **stavba orgánů a tkání** (proteiny kolagen, keratin atd.)
- **transport a skladování** (např. hemoglobin)
- **zajišťování pohybu** (např. aktin)
- **ochrana** (fibrin, imunoglobulin atd.)
- **katalýza chemických přeměn, řízení a regulace** (enzymy, hormony, receptory atd.)

Rostliny (ale i některé bakterie) si umí aminokyseliny syntetizovat samy. Naopak živočichové to neumí. Musí je proto přijímat v potravě, případně z různých preparátů. Těm, jež si tělo neumí vyrobit samo, se říká *esenciální aminokyseliny*. Dále existují *semiesenciální aminokyseliny*, které si tělo nedokáže vyrobit samo pouze za určitých podmínek, například v období růstu nebo při vážných zdravotních komplikacích (pro děti jsou proto tyto aminokyseliny esenciální). Posledním typem jsou *neesenciální aminokyseliny*, které si tělo umí vyrobit z jiných aminokyselin a látek, jejichž příjem není nutné tolik sledovat. V těle jsou přijaté proteiny rozkládány právě na aminokyseliny, ze kterých si následně organismus vyrábí celou řadu vlastních bílkovin. Až na několik výjimek jsou přitom proteiny v živých organismech vyrobeny pouze z 20 aminokyselin, které se nazývají biogenní či proteinogenní aminokyseliny. Celý rozbor je uveden v Dodatek D. Aminokyseliny.

1.2.4 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou biochemické makromolekulární látky, které jsou z hlediska svého původu blízké proteinům. Nukleové kyseliny jsou tvořeny polynukleotidovými řetězci, jež uchovávají genetické informace, které zajišťují přenos dědičných znaků do struktury proteinových molekul. Určují

tak činnost buňky a v podstatě tedy i celého organismu. Nukleové kyseliny se nacházejí prakticky uvnitř každé živé buňky a viru, přičemž jsou tedy odpovědné za reprodukci organismů a také přenos genetické informace z generace na generaci. Kapitola čerpá ze zdrojů: [5], [11] a [21].

Nejdůležitějšími a nejrozšířenějšími nukleovými kyselinami jsou **DNA** (kyselina deoxyribonukleová) a **RNA** (kyselina ribonukleová). Zatímco vlákno DNA obsahuje základní informace o funkci a vlastnostech organismu, RNA se stará převážně o zpracování a transport těchto informací. Strukturálně jsou tvořeny purinovými bázemi: adeninem a guaninem, a pyrimidinovými bázemi: cytosinem, thyminem (pouze u DNA) a uracilem (pouze u RNA).

Co se týče historie zkoumání nukleových kyselin, uveďme alespoň pár důležitých událostí.

1865 Mendelovy zákony dědičnosti.

1869 Johannes Friedrich Miescher objevil DNA pomocí izolace u bílých krvinek a hnisu.

1953 Francis Crick a James Watson objevili strukturu DNA (dvousřoubovice).

2003 Uveřejnění finální verze lidského genomu.

Jak již bylo zmíněno výše, funkcí kyseliny deoxyribonukleové (DNA) je uskladnění genetické informace, což znamená, že obsahuje primární strukturu bílkoviny, a to je dáno pořadím bází v její molekule. Druhou důležitou kyselinou je tedy kyselina ribonukleová (RNA), jež obstarává přenos dědičných znaků do struktury bílkovin (tzv. proteosyntéza), a tím pádem realizaci genetické informace. Jak nukleotidy DNA, tak RNA jsou přitom tvořeny pouhými čtyřmi bázemi, jejichž rozdílným pořadím je dosaženo ohromného počtu kombinací. Přitom právě sekvence jednotlivých nukleotidů (tzv. primární struktura) uchovávají genetickou informaci. DNA vytváří dvousřoubovici, v níž se dvě shodná polymerní vlákna kolem sebe obtáčejí, a to antiparalelně. V podstatě se přitom jedná o „originál“ a „záložní kopii“.

Při přenosu jsou genetické informace nejprve kopírovány na RNA, jež má jedno vlákno, a teprve ta dává informaci do pohybu. Smysluplná kombinace tří ze čtyř bází DNA aktivuje buňky k tomu, aby pojily aminokyseliny v určitém pořadí. Tak dochází k syntéze jednotlivých proteinů. Právě to přitom stanovuje podobu a fungování každého organismu a různé kombinace zase utvářejí diverzitu života na Zemi. Další informace k nukleovým kyselinám jsou uvedeny v Dodatek F. Nukleové kyseliny .

1.2.5 Peptidy

Přestože tuto skupinu organických látek nezařazujeme mezi ty nejdůležitější, je potřeba ji v této práci zmínit. Název peptidů je odvozen od názvů acylů aminokyselin, mění se pouze koncovka názvů. K peptidům patří antioxidanty (glutathion), peptidové hormony (liberiny, statiny, kalcitonin, glukagon, insulin a další), ale také peptidová antibiotika (cyklosporin a antinomycin). Dále známe i toxické peptidy jako jsou například amantiny a faloidiny. Celá kapitola čerpá z [5].

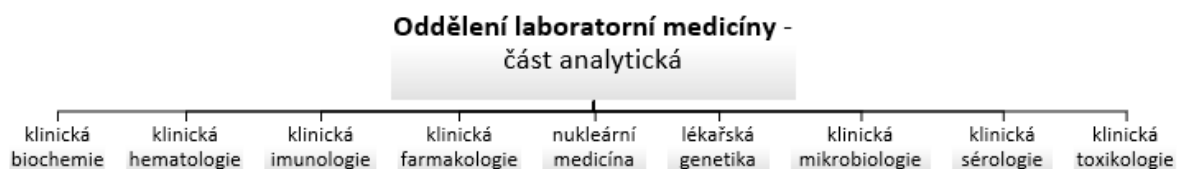
1.3 Klinická biochemie

Klinická biochemie je lékařský obor, který přispívá ke stanovení diagnózy či prognózy onemocnění a ke kontrole účinnosti terapie.

Klinická biochemie je dle IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) definována jako: „*Klinická biochemie je aplikací chemických, molekulárních a buněčných principů a technologií s účelem porozumět lidskému zdraví a nemoci a umožnit jejich hodnocení.*“

Obor čerpá teoretické znalosti z biochemie a patobiochemie. Na rozdíl od biochemie, která studuje složení organismů a regulaci v nich probíhajících přeměn. Patobiochemie studuje tyto přeměny při onemocnění, vedoucí k hromadění či ztrátě metabolitů a aktivaci jiných metabolických procesů.

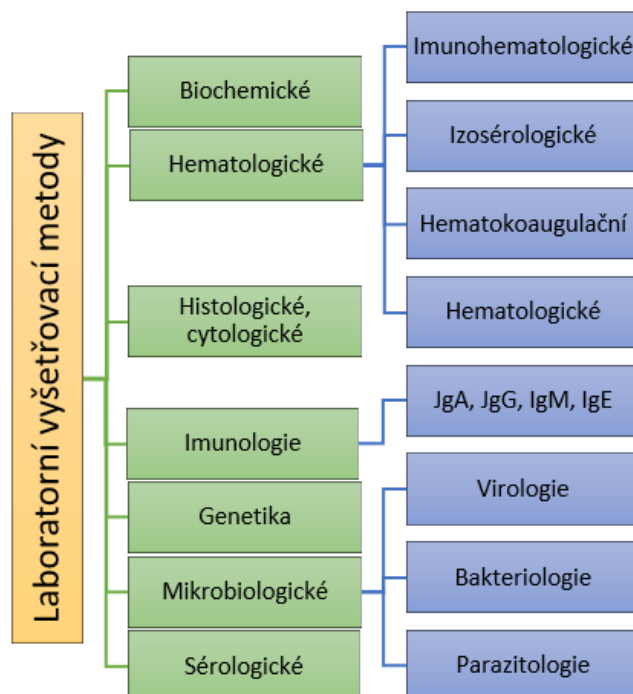
Dříve bylo toto odvětví zahrnováno do interní medicíny, dnes je to již samostatný oddělený obor o dvoustupňové atestaci. Je zahrnován do oddělení laboratorní medicíny. Největší změny v oboru klinické biochemie nastaly na konci 20. století, kdy došlo k rozvoji přístrojové techniky. Mechanizace byla nahrazena automatizací, proto dochází k přesnějšímu zpracování dat a rozvoji analytických metod, umožňujících stanovení různých látek ve stále nižších koncentracích. Díky rozvoji enzymové diagnostiky došlo ke zkvalitnění odhalení infarktu myokardu, jaterních onemocnění a jiných chorob. Konečnou doménou 20. století byl rozvoj diagnostiky dědičných onemocnění, díky klinické aplikaci DNA-diagnostiky [4].



Obrázek 1.4 Schéma ideálního organizačního rozdělení oddělení laboratorní medicíny. Upraveno podle [4].

2 Laboratorní vyšetřovací metody

V této kapitole budou blíže rozebrány biochemické laboratorní metody, které se využívají např. ve výše uvedené klinické biochemii. Kapitola čerpá z [4] a [16].



Obrázek 2.1 Schéma dělení laboratorních vyšetřovacích metod. Vlastní zdroj.

Biochemická vyšetření určují obsah anorganických a organických látek obsažených v příslušném materiálu (bílkoviny, glukóza, tuky, enzymy, léky...). Vyšetření tohoto druhu zahrnují také tzv. biochemické soubory zaměřené na jednotlivá onemocnění – jaterní soubor, srdeční soubor, ledvinový soubor apod. Laboratorní úlohy v praktické části této práce jsou věnovány právě tématu biochemických vyšetření.

Hematologická vyšetření určují vlastnosti krve a její složení. Lze je dále dělit na *imunohematologická* a *izosérologická* vyšetření sloužící k vyšetření skupinových vlastností krve, např. KS (krevní skupina) a Rh faktor, *hemokoaagulační* vyšetření, pomocí kterých zjišťujeme koagulační (srážlivé) poměry krve a *hematologická* vyšetření, kterými vyšetřujeme celý krevní obraz, ale i jiné složky krve.

Mikrobiologická vyšetření určují patogenní původce nemocí ze skupiny mikroorganismů. Podle typu patogenních organismů mikrobiologická vyšetření dělíme na *virologii*, *bakteriologii* a *parazitologii*.

Sérologická vyšetření poskytují průkazy přítomnosti protilátek v séru.

Histologická a cytologická vyšetření slouží ke zkoumání buněk, tkání.

Genetická vyšetření slouží k diagnostice a prevenci výskytu dědičných chorob.

Imunologická vyšetření se zabývají se zkoumáním imunitního systému, vyšetření antigenů IgA, IgG, IgM, IgE⁶. Když je jedinec poprvé vystaven působení cizorodé látky, viru nebo bakterii, imunitnímu systému může trvat až 14 dní, než vyprodukuje dostatečné množství specifické protilátky k odstranění infekce. V první fázi reakce se produkují protilátky třídy IgM. Po několika dnech/týdnech, obvykle poté co pomine bezprostřední nebezpečí a infekce ustoupí, tělo produkuje protilátky i třídy IgG. Tzv. imunologická paměť spolu s malým množstvím protilátek (IgM i IgG), které v oběhu přetrvávají, slouží k uchování informace o střetnutí s danou cizorodou látkou. V případě, že dojde k opětovnému kontaktu s tou samou cizorodou látkou, imunitní systém reaguje rychleji a silněji a vytváří především protilátky IgG).

2.1 Biochemické parametry vyšetření a vyšetřované materiály

V klinické biochemii je dnes vyšetřováno obrovské množství parametrů. Ať už se jedná o biochemické vyšetření onemocnění srdce, onemocnění plic či dýchacích cest, vyšetření zánětlivých procesů, nádorových onemocnění, onemocnění krve či neurologických onemocnění. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících chod organismu, níže jsou uvedeny nejpodstatnější z nich, zdroje [4] a [12].

- pH – vodíkový exponent (potential of hydrogen) je hodnota, která nám dle stupnice od 0 do 14 určuje kyselost/zásaditost prostředí. Je to důležitý faktor pro homeostázu celého organismu (stálost vnitřního prostředí). Často je tento faktor vyšetřován v moči, jelikož pokud je narušena acidita moči (pH v rozmezí 5–6), jedná se o patologický stav, moč je např. alkalická neboli zásaditá.

- Na, K, Ca, Mg – tyto biogenní prvky jsou zásadní pro chod organismu. Sodné ionty ovlivňují metabolismus vody (ta tvoří až 70 % našeho organismu), draslík je důležitý např. pro správné fungování sodno-draselných pump a organismus se špatně vyrovnává s jeho přebytkem i nedostatkem. Ca ovlivňuje převážně stavební látky organismu a Mg ovlivňuje správnou činnost svalové soustavy.

- Glukóza – je to monosacharid sledovaný jak v moči, tak např. v krvi (glykémie). Je to hlavní faktor sledovaný u pacientů s onemocněním diabetes mellitus (cukrovka).

- Urea – močovina neboli urea je látka, jejíž koncentrace je měřena převážně v moči a její nadbytek či deficit značí např. problémy s metabolismem zpracování bílkovin. Neměla by se ve velkém množství nacházet v krvi, jinak se jedná o patologický stav.

- Bilirubin – vzniká při rozpadu červených krvinek, např. při filtraci krve v ledvinách. Nadbytek bilirubinu značí onemocnění organismu.

- Enzymy – jsou základními látkami pro správný chod všech soustav. Srdeční a svalovou ovlivňuje např. CK (S-Kreatinkinasa) a AST (S-asparát-aminotransferasa).

K nejvíce vyšetřovaným ukazatelům zdravotního stavu pacienta pomocí laboratorních vyšetření patří krev (venózní neboli žilní, kapilární neboli cévní a arteriální neboli tepenní), moč, likvor⁷ či stolice.

⁶ Nejčastěji vyšetřovanými skupinami jsou IgM, IgG a IgE. Protilátky IgM a IgG spolupracují při krátkodobé či dlouhodobé ochraně před infekcí. IgE protilátky jsou asociovány s alergiemi [4].

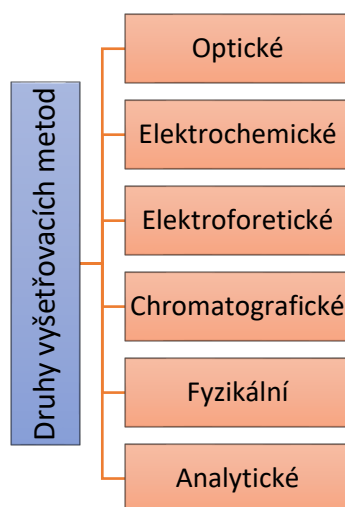
⁷ Likvor neboli mozkomíšní mok, je čirá tělní tekutina, která chrání a vyživuje mozek a míchu [4].

V krvi je vyšetřováno mnoho faktorů: ionty (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{+2} , Fe , Mg^{+2}), metabolity a dusíkaté látky (urea, kreatin, bilirubin), bílkoviny, enzymy, lipidy, glukóza, hormony, tumor markery, toxiny a krevní plyny (vyšetření acidobazické rovnováhy), [4] a [21].

Vyšetření moči dělíme na kvalitativní a kvantitativní. *Kvalitativní vyšetření* zahrnuje biochemický a mikroskopický rozbor vzorku, vyšetřuje se kvalita materiálu, resp. přítomnost či nepřítomnost organických a anorganických látek (bílkoviny, cukr, hlen a další). Při pozitivním nálezu následuje vyšetření množství, tedy kvantitativní vyšetření. *Kvantitativní vyšetření* se využívá k identifikaci množství patologicky přítomných látek. Moč se získává sběrem za určitou časovou jednotku (3 hod., 6 hod., 24 hod.). Často je využíván močový sediment dle Hamburgera, což je morfologické vyšetření moči (močový sediment). Dle testu se sleduje rychlost, s jakou jsou do moči vylučovány erytrocyty a leukocyty, [4] a [21].

U **vyšetřování stolice** je sledováno okultní (skryté) krvácení pomocí screeningu, dále jsou sledovány nenatrávené zbytky pomocí mikroskopického vyšetření (sledování poruch trávení). Pozornost je věnována také *Helicobacter pylori*, jež je mimořádně častý patogen (původce onemocnění), způsobuje velmi rozšířenou infekci bakteriálního původu, která zasahuje sliznici žaludku a dvanáctníku. Vyvolává různé trávicí potíže, časem způsobuje tzv. chronický aktivní zánět (gastritidu), nebo může dokonce vést ke vzniku karcinomu, [21] a [4].

2.2 Dělení vyšetřovacích metod



Obrázek 2.2 Schéma dělení vyšetřovacích metod dle principu metody. Zdroj vlastní.

Optické metody

Metody, které umožňují získat hodnoty koncentrace látek v biologickém materiálu a které jsou založeny na vzájemné interakci elektromagnetického záření se vzorkem, se souhrnně nazývají optické nebo spektrální metody. Kapitola čerpá ze zdrojů: [4], [5], [13] a [21].

Všechny níže uvedené optické metody jsou založeny na vzájemné interakci elektromagnetického záření se vzorkem, kdy při průchodu záření měřeným vzorkem (absorpčním prostředím) dochází k absorpci elektromagnetického záření (absorpční spektrofotometrie). Při

viditelné a UV spektrofotometrii se měří absorpce (úbytek záření) jako důsledek energetického přechodu elektronů molekulových orbitů do vyšších energetických stavů v oblasti 200–300 nm, při atomové absorpční fotometrii se sleduje absorpce záření zdroje atomy vzorku (kdy zdroj vysílá stejné záření o stejné energii, jako je absorbováno). U fluorimetrických stanovení se sleduje záření emitované vzorkem po předchozí absorpci (excitace elektronových stavů) ve viditelné a UV oblasti.

Tabulka 2.1 Přehled optických metod.

Název metody	Význam metody	Princip metody
Spektrofotometrie ve viditelné a blízké UV oblasti záření	Nejvíce využívaná metoda. Stanovení koncentrace látek a katalytické koncentrace enzymů.	
Turbimetrie a nefelometrie	Reakce, které jsou doprovázeny vznikem zákalu (turbidity), jsou využívány při imunochemickém stanovení koncentrace plazmatických bílkovin.	Měření optického rozptylu záření heterogenními částicemi.
Fluorimetrie (luminometrie)	Stanovení koncentrace hormonů, vitamínů a léčiv.	Určité látky po dodání energie vyzáří foton, používají se jako značky pro imunochemické reakce.
Atomová absorpční fotometrie	Stanovení koncentrace kovových iontů.	Měří se pokles intenzity spektrální čáry s určitou vlnovou délkou Fe, Cu, Mg, stopové prvky.
Infračervená spektrofotometrie	Slouží k identifikaci a kvalifikaci složek v biologickém materiálu.	
Fluorescenční polarizace	Sleduje průběhu imunologických reakcí a je aplikovatelná na homogenní reakce nízkomolekulárních analytů (např. léky).	Vzorek je excitován polarizovaným světlem, analyzátor polarizovaného světla je nastaven k měření intenzity emitované fluorescence světla ve vertikální ploše, pak se polarizační analyzátor otočí o 90° a měří se emitované záření v horizontální rovině.
Chemiluminiscence	Stanovení koncentrace hormonů, nádorových markerů, protilátek.	Luminiscence je emise světla při návratu elektronu z excitovaného stavu nebo vyšší energetické hladiny na nižší energetickou úroveň.

Dále známe metody **polarimetrické**, **refraktometrické** a **difrakční**, ty jsou založeny na měření jiných změn, kterým podléhá záření při interakci s hmotou (zpoždění elektromagnetické vlny při průchodu vzorkem, změně směru paprsku apod.)

Co se týká fotometrie, známe mnoho principů a metod měření. **Absorpční fotometrie** – měří se změna zbarvení roztoku. **Vertikální fotometrie** – svislé uspořádání v přístroji. Měření tzv. ELISA mikrotitračních destiček. **Reflexní fotometrie** – suchá chemie. Měří se intenzita odraženého světla. Slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení reakcí, které probíhají v pevné fázi. Reflexní fotometry měří odražené záření od homogenně zbarvené podložky.

Elektrochemické metody

Elektrochemie je fyzikálně-chemická metoda, která se zabývá vlastnostmi a reakcemi elektrolytu při průchodu elektrického proudu nebo za rovnovážných stavů. Všímá si především elektrické a energetické stránky chemických dějů probíhajících na styku elektrody a elektrolytu. Jejím hlavním zájmem jsou potenciálové rozdíly mezi elektrodou a roztokem elektrolytu, vyjádřené elektrodovými potencionály. Pevné látky nebo jejich roztoky, kterými prochází elektrický proud, musí být vodivé.

Elektrolyty mohou být kyseliny, zásady, soli. K tomu, aby probíhal elektrochemický děj, musíme do roztoku příslušných elektrolytů ponořit dvě elektrody. Spojíme-li obě elektrody se zdrojem stejnosměrného proudu, dojde k elektrolyze. Na katodě se objeví nadbytek elektronů a na anodě nedostatek elektronů proti původnímu neutrálnímu stavu. Anoda se snaží elektrony doplnit z částic roztoku a katoda naopak odevzdat elektrony částicím obsaženým v roztoku. Při průchodu elektrického proudu roztokem probíhá elektrolyza, při které se látky na anodě oxidují (odevzdávají elektrony) a na katodě se redukují (přijímají od ní elektrony). Na anodě se vylučují nekovy (elektronegativní látky) a na katodě kovy a vodík (obecně elektropozitivní látky).

Tabulka 2.2 Přehled elektrochemických metod.

Název metody	Význam metody	Princip metody
Potenciometrie	Získ evokovaných potenciálů (mV).	Elektrochemická metoda, při které se měří rozdíl potenciálu (napětí) mezi dvěma elektrodami (referenční a indikační) ponořenými do analyzovaného roztoku.
Polarografie	Závislost elektrického proudu na napětí, měří se směsí bílkovin.	Elektrolyza, kde při určitém napětí dochází k transportu látky k povrchu elektrody a k reakci na elektrodě, kde si látka s elektrodou vyměňuje elektrony a sama se oxiduje nebo redukuje.
Coulometrie	Množství elektrického náboje prošlého analyzovaným roztokem (měření coulombů).	Při elektrolyze vzorku se registruje závislost proudu (I) na čase (t). Z velikosti prošlého náboje (Q) se pomocí Faradayových zákonů vypočte množství stanovené látky (m). Analyt je stanoven z velikosti náboje prošlého elektrodou.
Konduktometrie	Měření schopnosti vést proud u elektrolytu.	Elektrická vodivost roztoků závisí na koncentraci iontů v roztoku, kontroluje se kvalita vody pro analyzátoři.

Elektroforetické metody

Elektroforetické metody se používají k dělení látek, které nesou elektrický náboj – tj. koloidních částic (bílkovin) nebo iontů. Umožňují jejich dělení podle rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Tato pohyblivost závisí především na velikosti elektrického náboje, na velikosti molekuly, pH prostředí, vlastnostech nosiče, iontové síle pufru a tvaru dělených částic. V klinické biochemii se elektroforéza používá hlavně pro analýzu bílkovin v biologických tekutinách (nejčastěji v séru a moči). Její princip je založen na pohybu makromolekul v elektrickém poli.

Chromatografické metody

Chromatografické metody umožňují nejenom dělení velmi složitých směsí, ale též identifikaci a kvantitativní stanovení jednotlivých látek. Používají se také k izolaci látek ve velmi čistém stavu, k analytické kontrole čistoty léčiv. Mají široké uplatnění v biomedicíně (izolace bílkovin, enzymů, nukleových kyselin), rovněž ve farmakologii a toxikologii (terapeutické monitorování hladiny léčiv, sledování léčby u toxikomanů, nebo třeba u stanovení léčiv a toxických látek v biologickém materiálu). V klinické biochemii mají význam při dělení steroidů, lipidů, aminokyselin, sacharidů, katecholaminů, vitamínů, hormonů, antibiotik ad.).

Při chromatografické analýze se k identifikaci a stanovení dělených látek využívá jejich rozdílné pohyblivosti při dělení a chování při detekci. Chromatografické metody se zakládají na postupném ustavování rovnováhy dělených látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (s výjimkou afinitní chromatografie).

Nepohyblivou, tj. stacionární fázi tvoří materiál, kterým je plněna chromatografická kolona, nebo ze kterého je zhotovena tenká vrstva, na které dělení probíhá. U rozdělovací chromatografie je nepohyblivou fází kapalina vázaná na povrch pevného nosiče.

Pohyblivou, tj. mobilní fázi představuje kapalina, eluční činidlo (rozpouštědlo, pufr apod.) či plyn, kterými jsou jednotlivé složky z kolony nebo tenké vrstvy vymývány. Dělené látky jsou různou rychlostí unášeny ve směru toku pohyblivé fáze a s různou silou zadržovány na pevné fázi. Tím dochází k rozdělení směsi.

Typy chromatografie:

- **papírová chromatografie** – dnes se prakticky nepoužívá
- **chromatografie na tenké vrstvě (TLC)** – nejpoužívanější, využívá se např. silikagelu, k identifikaci bílkovin
- **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)** – identifikace vitamínů a léků
- **plynová chromatografie**

Fyzikální metody

K fyzikálním metodám patří *osmometrie* – princip: osmotický tlak závisí na koncentraci osmoticky aktivních látek. Dále sem patří např. laserová *cytometrie* – princip: laserem se proměřuje velikost a tvar částice procházející kapilárou, příp. se porovnává s atlasem. Slouží ke stanovení močového sedimentu, krevního obrazu.

Analytické metody

K analytickým metodám řadíme již výše rozebrané potenciometrické metody, ale také separační metody (elektroforéza a chromatografie). Kromě zmíněných sem patří kolorimetrické metody. Ty jsou založené na principu spektrofotometrie. Principem metody je porovnávání intenzit barevných roztoků.

Praktická část

3 Sada laboratorních úloh

Laboratorní biochemické metody mají veliký význam pro vývoj biomedicínské techniky a celého zdravotnického systému. Základní dělení a principy metod byly uvedeny výše v kapitole 2. V kapitole jsou uvedeny:

- přehled potřebných chemických pomůcek
- specifikace použitých přístrojů
- zásady práce v laboratořích
- vytvořené laboratorní úlohy na základě zadání této bakalářské práce

3.1 Zásady práce v laboratořích

V chemických laboratořích, ale i ve výzkumných a experimentálních laboratořích technických škol, může dojít k různým poškozením zdraví. Proto je nutné dodržovat zásady bezpečnosti práce a vyvarovat se zbytečnému riziku zranění. Kromě zranění zapříčiněných neopatrnou manipulací s elektrickými přístroji či se sklem, mohou být život ohrožující i použité chemikálie. Chemikálie mohou působit na kůži a sliznici, na dýchací cesty, ale i na zažívací trakt. Studenti by měli být před zahájením laboratorních cvičení obeznámeni se zákonem č. 356/2003 Sb. Aby nedošlo k újmě na zdraví, je třeba držet se těchto zásad:

1. Během práce provádíme pouze úkony dle pokynů vyučujícího.
2. Seznámíme se s rozmístěním únikových východů z laboratoře a umístěním hasicích přístrojů.
3. V laboratoři nikdy nic nekonzumujeme, nepijeme, nekouříme a nepožíváme jiné omamné látky.
4. Po ukončení práce si důkladně umyjeme ruce a zkontrolujeme čistotu ochranného oblečení.
5. Tašky a přebytečné oblečení uložíme na vyhrazené místo mimo laboratoře.
6. V laboratoři vždy nosíme pracovní plášť, ochranné gumové rukavice, ochranné brýle a vhodnou obuv.
7. Neprovádíme opravy nebo úpravy na elektrických instalacích a přístrojích.
8. Chemikálie nikdy nezkoušíme ústy a snažíme se neinhlovat výpary, prostory větráme.
9. Při práci se žíraviny či jinak nebezpečnými látkami si chráníme obličej ochranným štítem a oči ochrannými brýlemi. Ruce ochrannými gumovými rukavicemi.
10. Na pracovišti neustále udržujeme pořádek a čistotu, chemikálie netřísníme na okolní pomůcky.
11. Při provádění zkumavkových pokusů držíme ústí zkumavek odvrácené od svého obličeje, stejně tak od obličeje spolupracovníka.
12. Při práci s hořlavinami nesmí být v blízkosti pokusu otevřený oheň.
13. Zbytky jedů a chemikálií likvidujeme podle pokynů vyučujícího.
14. O případné nehodě neprodleně informujeme vyučujícího a poskytujeme první pomoc.
15. Po skončení práce uzavřeme vodu, vypneme elektrické spotřebiče a všechny očištěné potřeby vrátíme na svá místa.

3.1.1 První pomoc při nehodě

1. Při poleptání kůže silnou kyselinou či silnou zásadou místo okamžitě důkladně omyjeme proudem vody.
2. Při zásahu oka chemikálií ho ihned vypláchneme slabým proudem vody, následně vyhledáme odborné vyšetření očního lékaře.
3. Při poleptání ústní sliznice musíme dutinu ústní důkladně vypláchnout vodou.
4. Při požití chemikálií je doporučena konzumace vlažné vody. To neplatí, pokud se jedná o louh či kyselinu. Drážděním hrdla poté vyvoláme zvracení, ne pokud má požitá látka pH pod 2 a nad 12, nebo jedná-li se o pěnотvornou látku. Vždy je nutné vyhledat odbornou lékařskou pomoc.
5. Při popálení je nutné postižené místo schladit studenou vodou. Odstranění látky z místa popáleniny necháme na odbornících, postižená místa pouze zakryjeme sterilním obvazem. Při popálení očí je vhodná borová voda nebo jiný nezávadný druh vody. Vždy je nutné vyhledat odbornou lékařskou pomoc.
6. Při pořezání sklem je nutné odstranit z rány sklo, nevyplachujeme. Při řezných ránách je vhodné dezinfikovat okolí peroxidem vodíku a ovázat ránu sterilním obvazem. V případě větších zranění musíme vyhledat lékařskou pomoc.
7. Při otevřeném krvácení je třeba zastavit krvácení a následně zabránit kontaminaci rány.
8. Při inhalaci škodlivých látek musí být postižený ihned odveden na čerstvý vzduch. Musí mu být uvolněny dýchací cesty a musíme zajistit lékařskou pomoc. Nedýchá-li, zahájíme umělé plicní dýchání.

Všechny úrazy ihned hlásíme vyučujícímu.

Tvorba těchto bodů byla inspirována zdrojem [9].

3.2 Identifikace aminokyselin

Cíl úlohy

Prostřednictvím této úlohy se naučíte:

- Provést základní rozbor roztoků a použitých vzorků.
- Pracovat s jednoduchým chemickým vybavením.
- Realizovat základní metody k identifikaci aminokyselin.

Zadání

1. Pomocí ninhydrinové reakce potvrďte přítomnost aminokyselin ve vzorcích.
2. Pomocí metody TLC chromatografie identifikujte aminokyseliny ve vzorcích.

Použité vybavení

Pomůcky:

- sada zkumavek
- sada kádinek
- laboratorní váha
- ochranné rukavice a oděv (ninhydrin způsobuje podráždění kůže)
- kahan
- držák na zkumavky
- periodická soustava prvků
- kalkulačka
- hliníková folie Silufol (15 x 15 cm)
- pipeta
- vyvíjecí soustava (vana či velká nádoba)
- pravítko
- fén

Chemikálie a látky:

- 0,2% roztok ninhydrinu (2,2-dihydroxy-1,3-indandionu) v ethanolu
- vzorky: 2% roztok alaninu ve vodě
0,1% roztok tyrosinu ve vodě
2% roztok glycinu ve vodě
2% roztok vaječného albuminu ve vodě (albumin ze syrového vaječného bílku)
- mobilní fáze pro TLC: butanol, kyselina octová a voda (4:1:1)

Teoretický rozbor

V podstatě známe 20 základních aminokyselin, ze kterých se bílkovinné řetězce v živých organismech skládají (proteinogenní): glycin, alanin, arginin, asparagin, kyselina asparagová, cystein, glutamin, kyselina glutamová, histidin, izoleucin, leucin, lysin, fenylalanin, methionin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin. Někdy se lze setkat i se selenocysteinem či pyrolysinem, ty jsou považovány za 21. a 22. proteinogenní aminokyselinu.

Aminokyseliny mají svou roli i při dalším členění bílkovin. K tzv. jednoduchým proteinům patří bílkoviny, které jsou složeny pouze z těchto svých základních látek (aminokyselin). U složených proteinů (glykoproteiny, nukleoproteiny, lipoproteidy, metaloproteiny nebo fosfoproteidy) jsou potom na aminokyseliny vázány i jiné substituenty.

Nejdůležitější vlastností aminokyselin je schopnost tvořit řetězce za vzniku peptidů nebo proteinů. Mezi aminokyselinami vznikají tzv. **peptidové vazby** ($-\text{CO}-\text{NH}-$), které vznikají reakcí α -karboxylové skupiny jedné aminokyseliny s α -aminoskupinou aminokyseliny druhé. Při reakci dochází k vyloučení vody, tato reakce může probíhat také naopak. Příměs vody může peptidovou vazbu rozložit na původní aminokyseliny. Této vlastnosti se využívá u většiny identifikačních metod.

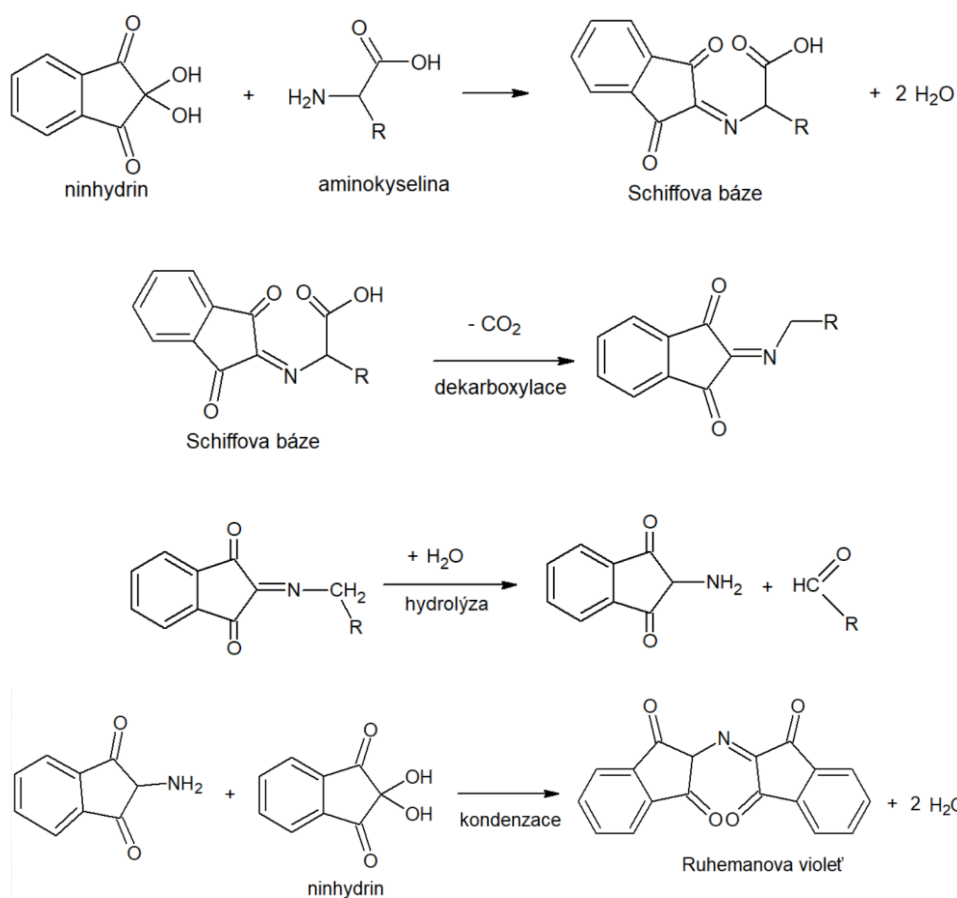
Všechny aminokyseliny lze klasifikovat podle vzdálenosti aminoskupiny od karboxylové skupiny. Dělíme je na *α -aminokyseliny*, kde je aminoskupina hned vedle skupiny karboxylové, *β -aminokyseliny*, které jsou od karboxylové skupiny vzdálenější o jeden uhlík, *γ -aminokyseliny*, vzdálené o dva uhlíky, a další. Lze je dělit na esenciální, semiesenciální nebo neesenciální. Celý rozbor je uveden v Dodatek D. Aminokyseliny.

K identifikaci aminokyselin v různých vzorcích lze využít mnoho laboratorních metod. Např. Xantoproteinové reakce, Adamkiewiczovi reakce, Ninhydrinové reakce, ale také chromatografie. V této laboratorní úloze se budeme věnovat ninhydrinové reakci předcházející metodě chromatografie na tenké vrstvě (TLC).

Ninhydrinová reakce se využívá pro vizuální stanovení aminokyselin. Lze ji použít k identifikaci: aminů, α -aminokyselin (včetně proteinů), amino-cukrů a alkaloidů (obsahujících NH a NH_2). V lékařství se využívá k vyšetření poruch metabolismu aminokyselin. Reakce je používána jako detekční při následné identifikaci aminokyselin v moči a krvi pomocí chromatografie (stejně jako v této úloze). Metoda hraje svou roli např. ve forenzní vědě, jelikož napomáhá identifikovat přítomnost tuků na povrchu různých předmětů.

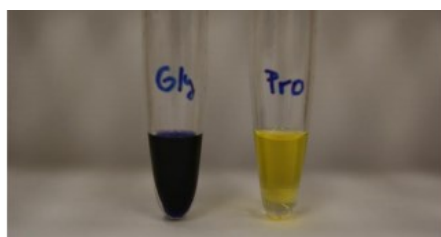
Čistý ninhydrin je bílý nebo žlutý krystal, který je při zahřátí dobře rozpustný ve vodě či dalších rozpouštědlech. Jedná se o velmi nebezpečnou látku při styku s kůží, proto při práci postupujte opatrně (kožní bílkovina reaguje s ninhydrinem a barví kůži do fialova).

Reakční mechanismus ninhydrinové reakce:



Obrázek 3.1 Ninhydrinová reakce: ninhydrin interaguje s aminokyselinou (vznik Schiffovy báze), poté je kondenzační produkt dekarboxylován (uvolnění oxidu uhličitého) a následně je vyloučen aldehyd pomocí hydrolýzy. Díky konečné kondenzaci vzniká tzv. Ruhemanova violeť, jejíž charakteristická purpurová barva značí přítomnost aminokyseliny. Vlastní zdroj, vytvořeno v aplikaci ChemSketch. Inspirováno [8].

Pokud se ve vzorku nachází aminokyselina, dojde po ninhydrinové reakci k charakteristickému červenofialovému zbarvení (tzv. Ruhemanova violeť). Jinak je tomu pouze v přítomnosti prolinu, který výsledný vzorek barví do žluta.



Obrázek 3.2 Ninhydrinová reakce: reakce glycinu a prolinu [22].

Příprava roztoků a základní vzorce potřebné k vypracování úlohy:

HMOTNOSTNÍ ZLOMEK

Hmotnostní zlomek (w) určuje podíl hmotnosti jedné složky směsi na celkové hmotnosti směsi. Je to bezrozměrné číslo, nemá jednotku.

$$w = \frac{m(s)}{m(c)} \times 100, \quad (3.2.1)$$

kde w značí hmotnostní zlomek, $m(s)$ je hmotnost složky směsi a $m(c)$ je celková hmotnost směsi. Všechny veličiny musí mít stejné hmotnostní jednotky (gramy, kila, tuny). K přípravě roztoků používáme upravený výraz pro výpočet hmotnostního zlomku složky ve směsi:

$$w = \frac{m(s)}{m(r)+m(s)} \times 100, \quad (3.2.2)$$

kde $m(r)$ značí hmotnost rozpouštědla.

MOLÁRNÍ HMOTNOST

Molární hmotnost (M) uvádí hmotnost jednoho molu látky, kde 1 mol je základní fyzikální veličina látkového množství. Celková molární hmotnost sloučeniny je poté součtem molárních hmotností v ní obsažených prvků, součet relativních atomových hmotností.

$$M = \frac{m}{n}, \quad (3.2.3)$$

kde M značí molární hmotnost v jednotkách g/mol, m je hmotnost látky v gramech a n je látkové množství uváděné v jednotkách molů.

Chromatografie umožňuje účinnou separaci látek. Ta je nutná pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek sledované látky. Látky se liší svými adsorpčními vlastnostmi, rozdělovacími koeficienty, náboji atd., což se využívá v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé).

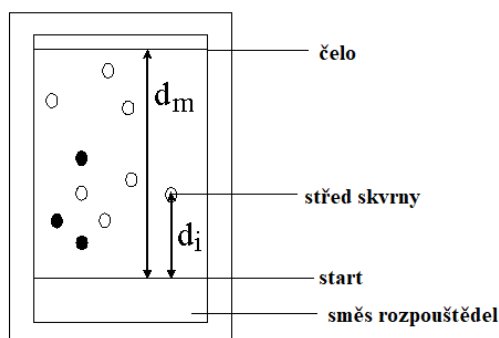
Stacionární fází může být pevná látka (papír, SiO_2 , Al_2O_3) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči. Mobilní fází pak bývá kapalina či plyn. Podle způsobu uspořádání chromatografického zařízení dělíme chromatografii na sloupcovou a plošnou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fází pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou atd.

V tenkovrstvé chromatografii (TLC) se stacionární fáze nanáší na destičky ze skla, hliníku či plastu. Mobilní fází je směs organických rozpouštědel (nejčastěji se používá ethanol, aceton, chloroform, benzen). Mobilní fáze rozpouští složky vzorku a unáší je vzhůru po povrchu destičky. Jelikož jednotlivé složky vzorku interagují se stacionární fází různě (tzn. jsou různě intenzivně brzděny oproti čelu mobilní fáze), dochází k jejich vzájemnému rozdělení.

Migrační chování jednotlivých separovaných látek vyjadřuje získaný chromatogram, kde pro každou separovanou látku můžeme definovat hodnotu retenčního (retardačního) faktoru:

$$R_F = \frac{b}{a}, \quad (3.2.4)$$

kde a je vzdálenost mezi čelem mobilní fáze (tj. linií, kam až dostoupala mobilní fáze během separace) a linií startu, b je vzdálenost středu skvrny separované látky od linie startu.



Obrázek 3.3 Schéma TLC metody [9].

α -Aminokyselina	Zkratky	Symbols	pK_1 (α -COOH)	pK_2 (α -NH ₃ ⁺)	pK_R postranní řetězec
Alanin	Ala	A	2,35	9,87	
Arginin	Arg	R	1,82	8,99	12,48 (guanidium)
Asparagin	Asn	N	2,10	8,84	
Asparagová kyselina	Asp	D	1,99	9,90	3,90 (β -COOH)
Cystein	Cys	C	1,99	10,78	8,33 (-SH)
Fenylalanin	Phe	F	2,16	9,18	
Glutamin	Gln	Q	2,17	9,13	
Glutamová kyselina	Glu	E	2,10	9,17	4,07 (γ -COOH)
Glycin	Gly	G	2,35	9,78	
Histidin	His	H	1,80	9,33	6,04 (imidazolium)
Isoleucin	Ile	I	2,33	9,76	
Leucin	Leu	L	2,33	9,74	
Lysin	Lys	K	2,16	9,18	10,79 (ϵ -NH ₃ ⁺)
Methionin	Met	M	2,13	9,28	
Prolin	Pro	P	2,95	10,65	
Serin	Ser	S	2,19	9,21	
Threonin	Thr	T	2,09	9,10	
Tryptofan	Trp	W	2,43	9,44	
Tyrosin	Tyr	Y	2,20	9,11	10,13 (fenolický -OH)
Valin	Val	V	2,29	9,74	

Obrázek 3.4 Seznam kyselin a jejich acidobazických vlastností [9].

Všechny aminokyseliny mají dvě nebo tři (s postranním řetězcem odštěpujícím proton) acidobazické skupiny charakterizované hodnotami pK_a . Hodnotě pH, při které má molekula celkový nulový elektrický náboj, se říká izoelektrický bod, pI . Molekula je v tomto stavu nejméně rozpustná. Z Henderson-Hasselbachovy rovnice pro α -aminokyseliny vyplývá:

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}, \quad (3.2.5)$$

kde pK_1 a pK_2 jsou disociační konstanty dvou ionizací, jejichž výsledkem je elektroneutrální forma molekuly. K výjimkám patří kyselina asparagová a glutamová, dosazuje se K_1 a K_R , dále pak histidin, lysin a argininu, u nichž je třeba dosadit hodnoty K_2 a K_R .

Pracovní postup

Postup k bodu č. 1. zadání: Ninhydrinová reakce

1. Připravte roztoky jednotlivých vzorků o koncentraci uvedené v zadání, množství vody a jednotlivých vzorků s aminokyselinami uveďte do tabulky (Tabulka 3.2).
2. Do čtyř zkumavek připravte následující reakční směsi:

Tabulka 3.1 Obsahy jednotlivých zkumavek.

	1. zkumavka	2. zkumavka	3. zkumavka	4. zkumavka
2% ⊙ alaninu [ml]	1 ml	/	/	/
0,1% ⊙ tyrosinu [ml]	/	1 ml	/	/
2% ⊙ glycin [ml]	/	/	1 ml	/
2% ⊙ vaječného albuminu [ml]	/	/	/	1 ml
0,2% ⊙ ninhydrinu [ml]	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

3. Po přípravě směsí ve zkumavkách (bod 2.) vypočítejte aktuální koncentraci alaninu, tyrosinu, glycinu a albuminu ve zkumavkách, doplňte do tabulky (Tabulka 3.2). Použijte vzorec pro výpočet hmotnostního zlomku, viz teoretický rozbor výše.
4. Vypočítejte molární hmotnost a látkové množství použitého alaninu, tyrosinu, glycinu, albuminu a ninhydrinu, uveďte do tabulky (Tabulka 3.2).
5. Obsah ve zkumavkách promíchejte, zahřívejte opatrně nad kahanem či ve vroucí vodní lázni a zaznamenejte změny zbarvení.
6. Do protokolu přidejte fotografii výsledného zbarvení všech směsí ve zkumavkách.

Postup k bodu č. 2. zadání: Metoda TLC chromatografie

1. Na Silufol (hliníkovou folii) vyznačte 2,5 cm od spodního okraje tenkou linií tužkou (start).
2. Těsně pod tzv. start udělejte popisky pro pozdější identifikaci aminokyselin.
3. Využijte zabarvených vzorků alaninu, glycinu a tyrosinu z předchozího postupu.
4. Na vyznačenou linii (start) naneste kapilárou jednotlivé vzorky (kapiláru udržujte čistou při nabírání nových vzorků). Jakmile se kapka vzorku vsákne do vrstvy silikagelu, opakujte postup, dokud nevznikne skvrna o velikosti asi 2–3 mm dostatečně daleko od sebe (mezi jednotlivými nanášeními skvrny usušte opatrně fénem).
5. Takto připravený Silikagel vložte do vyvíjecí soustavy (nádoba s mobilní fází) tak, aby mobilní fáze sahala k hranici startu.
6. Počkejte zhruba 30 minut, nebo dokud mobilní fáze nevystoupá asi 4 cm nad hranici startu.
7. Vyznačte čelo mobilní fáze, hranici stoupání skvrny. Dále obtáhněte skvrnu, kterou po sobě barvivo zanechalo.
8. Nechte hliníkovou vrstvu vysušit.
9. Změřte vzdálenost a (od startu k čelu) a vzdálenost b (od startu ke středu skvrny). Výsledky zaznamenejte do tabulky (Tabulka 3.2). Vypočítejte retenční faktory vzorků a v závěru je porovnejte s tabulkovými hodnotami.
10. Vypočítejte izoelektrický bod u jednotlivých aminokyselin uvedených v tabulce (Tabulka 3.3). K protokolu přiložte fotografii chromatogramu z vyznačenými vzdálenostmi a , b .

Výsledky

Tabulka 3.2 Výpočetní rozbor roztoků a vzorků.

	Počáteční roztok			Roztok ve zkumavkách	Rozbor vzorků	
	Hmotnostní zlomek (koncentrace v roztoku) w [%]	Hmotnost vzorku $m(s)$ [g]	Hmotnost rozpouštědla (vody) $m(r)$ [ml]	Hmotnostní zlomek (koncentrace) w [%]	Molární hmotnost M [g/mol]	Látkové množství n [mol]
Alanin	2		100			
Tyrosin	0,1		100			
Glycin	2		100			
Vaječný albumin	2		100		/	/
Ninhydrin	0,2		100	/		/

Tabulka 3.3 Retenční faktory a izoelektrické body.

	Tabulkový R_F [-]	a [mm]	b [mm]	Získaný R_F [-]	pI [-]
Alanin	0,3				
Tyrosin	0,55				
Glycin	0,25				

Kontrolní otázky

1. Jak se zabarví obsah zkumavky v přítomnosti prolinu po provedení ninhydrinové reakce a proč?
2. Který zkoumaný vzorek aminokyseliny měl největší izoelektrický bod a co nám tento bod udává?
3. K čemu slouží retenční faktor a jak ho vypočítáte?
4. Kolik znáte proteinogenních aminokyselin a jak lze aminokyseliny obecně klasifikovat/dělit?

Závěr

Použitá literatura

[8], [9], [14], [22], [23] a [26].

3.3 Stanovení proteinů

Cíl úlohy

Prostřednictvím této úlohy se naučíte:

- Pracovat se stolním spektrometrem.
- Základní výpočty a poznatky z oblasti fotometrie.
- Identifikovat proteiny a stanovit jejich koncentraci ve vzorcích.

Zadání

1. Provedte primární identifikaci proteinů pomocí biuretové reakce.
2. Pomocí metody Bradfordové provedte stanovení proteinů ve vzorcích.

Použité vybavení

Pomůcky:

- sada zkumavek
- ochranné pomůcky, rukavice
- kádinka
- kahan
- držák na zkumavky
- pipeta
- laboratorní váha
- spektrofotometr a spektrofotometrické kyvety

Chemikálie a látky:

- vaječný bílek
- fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl)
- 10% roztok hydroxidu sodného (NaOH)
- 1% roztok síranu měďnatého (CuSO_4)
- močovina v prášku
- protein (např. sérový hovězí albumin – BSA)
- ethanol
- kyselina fosforečná (H_3PO_4)
- destilovaná voda
- dodecylsírán sodný (SDS)
- Coomassie Brilliant Blue G-250

Teoretický rozbor

Bílkoviny neboli odborně proteiny patří mezi organické sloučeniny, které jsou zásadně důležité pro všechny živé organismy. Z chemického hlediska se jedná o polymery složené nejméně ze dvou *aminokyselin*, jež jsou spojeny peptidovou vazbou. Právě podle množství aminokyselin jsou proteiny děleny na **oligopeptidy** (2 až 10 aminokyselin), **polypeptidy** (11 až 100 aminokyselin) a do třetice **vlastní proteiny** (více než 100 aminokyselin).

Aminokyseliny mají svou roli i při dalším členění bílkovin. K tzv. *jednoduchým proteinům* patří bílkoviny, které jsou složeny pouze z těchto svých základních látek (aminokyselin). U *složených proteinů* (glykoproteiny, nukleoproteiny, lipoproteidy, metaloproteiny nebo fosfoproteidy) jsou potom na aminokyseliny vázány i jiné substituenty. Bílkoviny jsou převážně kódovány v deoxyribonukleové kyselině (DNA) organismů.

Funkce proteinů:

- **stavba orgánů a tkání** (proteiny kolagen, keratin atd.)
- **transport a skladování** (např. hemoglobin)
- **zajišťování pohybu** (např. aktin)
- **ochrana** (fibrin, imunoglobulin atd.)
- **katalýza chemických přeměn, řízení a regulace** (enzymy, hormony, receptory atd.)

V těle jsou přijaté proteiny rozkládány právě na aminokyseliny, ze kterých si následně organismus vyrábí celou řadu vlastních bílkovin. Až na několik výjimek jsou přitom proteiny v živých organismech vyrobeny pouze z 20 aminokyselin, které se nazývají biogenní či proteinogenní aminokyseliny. Celý rozbor je uveden v Dodatek D. Aminokyseliny.

K identifikaci proteinů a ke stanovení jejich koncentrace ve vzorcích jsou využívány různé metody. Kolorimetrické metody, srážecí metody, ale hlavně optické metody. Před každou optickou metodou by měla být část vzorku odebrána, aby byla ověřena přítomnost proteinu v daném vzorku. Typická je pro to např. Hartree-Lowryho metoda nebo biuretová reakce.

Biuretová reakce je využívána k důkazu peptidové vazby. Název reakce je odvozen od sloučeniny biuretu, což je produkt kondenzace dvou molekul močoviny za odštěpení amoniaku, tzv. tavení močoviny. Biuretová metoda je vhodná pro vzorky obsahující proteiny o koncentraci 1 až 10 mg/ml, které se ředí na konečnou koncentraci proteinu 0,2 až 2 mg/ml. Většina proteinů poskytuje tmavě červené zbarvení s maximem absorpce při 550 nm. V přítomnosti vysoké koncentrace albuminu je výsledné zbarvení spíše fialové. S klesající koncentrací proteinu klesá i intenzita zbarvení.

Metody, které umožňují získat hodnoty koncentrace látek v biologickém materiálu a které jsou založeny na vzájemné interakci elektromagnetického záření se vzorkem, se souhrnně nazývají optické nebo spektrální metody. Právě proto je v mnoha metodách stanovujících koncentraci proteinů potřebný spektrofotometr. Využívá se zde možnost měření absorpce při různých vlnových délkách. Analyzované vzorky jsou umísťovány do křemičitých kyvet, které jsou následně vsunuty do spektrofotometrů. Princip spektrofotometrů spočívá v porovnávání intenzity zdrojem vysílaného záření a intenzity záření odraženého zpět k detektoru. Část energie je analyzovaným roztokem absorbována a absorbované množství je úměrné koncentraci analyzované látky v roztoku.

Ke známým fotometrickým metodám patří např. stanovení z UV spektra či metoda Bradfordové. Tato metoda je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a triarylmetanovým barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 v kyselém prostředí. Po vazbě na protein se absorpční maximum G-250 posunuje z 465 na 595 nm. Právě absorpční maximum slouží ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku. Absorpční maximum lze vyčíst z grafu absorpčního spektra. Měříme-li absorbanci ve vlnové délce absorpčního maxima, lze koncentraci proteinu vypočítat podle vzorců:

$$c_x = c_{st} \times \frac{A_x}{A_{st}}, \quad (3.3.1)$$

kde c_x značí koncentraci neznámého vzorku, c_{st} značí koncentraci měřeného standardu, A_{st} je absorbance měřeného standardu a A_x je naměřená absorbance neznámého vzorku.

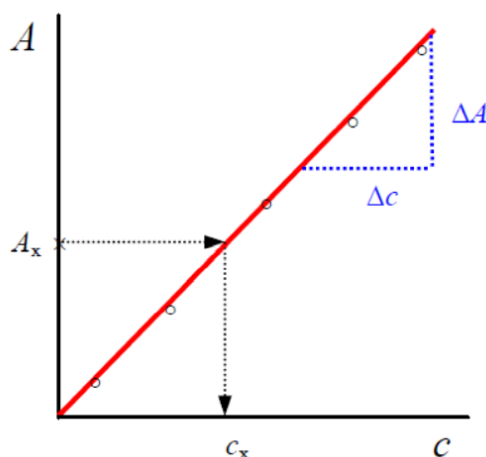
$$c_x = F \times A_x, \quad (3.3.2)$$

kde F značí kalibrační faktor, který lze vypočítat:

$$F = \frac{\sum c_n}{\sum A_n}, \quad (3.3.3)$$

kde c_n značí koncentraci látky ve vzorku a A_n je absorbance tohoto vzorku. Směrnice přímky k se vypočítá z kalibračního faktoru:

$$k = \frac{1}{F}. \quad (3.3.4)$$

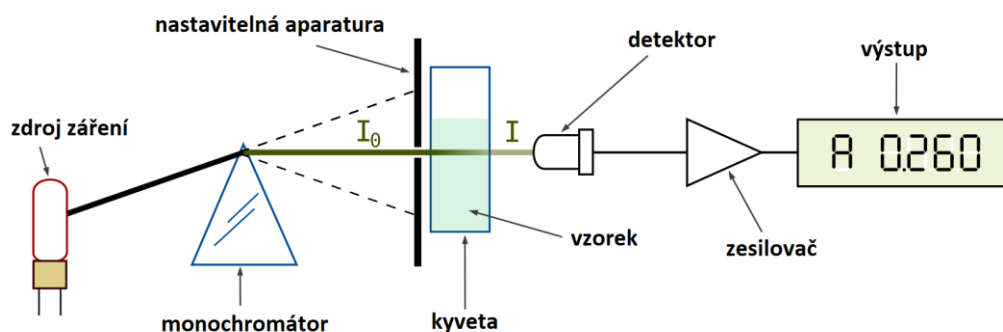


Obrázek 3.5 Ukázka kalibračního grafu [25].

U spektrofotometrického měření se kromě absorbance uvádí také pojem transmittance. Ta udává množství světla dané vlnové délky (λ), které prošlo identifikovaným vzorkem. Tato veličina se udává v procentech a pro její výpočet je charakteristický tento vztah:

$$A_x = -\log(T), \quad (3.3.5)$$

kde je A_x naměřená absorbance neznámého vzorku a T je transmittance vzorku při stejných podmínkách.



Obrázek 3.6 Princip funkce kyvetového spektrofotometru [30].

Pracovní postup

Postup k bodu č. 1 zadání: Biuretová reakce

1. Připravte roztok bílkovin: oddělte bílek od žloutku vajíčka a smíchejte jej v kádince s 50 ml fyziologického roztoku.
2. Do suché zkumavky vložte pár krystalků močoviny. Zahřívejte nad slabým plamenem. Dojde k roztavení močoviny, jakmile začne močovina opět tuhnout, přestaňte obsah zahřívat. Nechte močovinu vychladnout.
3. Zahříváním vytvoříte biuret, ke kterému přidejte 1 ml hydroxidu sodného. Protřepte.
4. Přidejte do zkumavky 1 až 2 kapky síranu měďnatého. Protřepte a zkoumejte výsledné zbarvení. Opatrně s množstvím síranu!
5. Do druhé suché zkumavky napipetujte 1 ml připraveného roztoku bílkovin, dále 1 až 2 ml hydroxidu sodného a 1 až 2 kapky síranu měďnatého. Protřepte a zkoumejte výsledné zbarvení.
6. Do protokolu přidejte fotografie konečného zbarvení a zhodnoťte.

Postup k bodu č. 2 zadání: Metoda Bradfordové

1. Připravte Bradfordovo činidlo: 10 mg Coomassie Blue G-250 rozpustíte v 5 ml 100% ethanolu a 10 ml alespoň 85% kyseliny fosforečné, doplňte do 100 ml vodou.
2. Připravte zásobní roztok hovězího sérového albuminu (BSA): 10 mg albuminu rozpustíte ve 100 ml vody.
3. Připravte si roztok koncentraci 25 µg/ml tak, že do nové baňky připravíte 25 ml zásobního roztoku z 2. bodu a doplníte do 100 ml vodou.
4. Dále připravte standardy o koncentraci dle tabulky:

Tabulka 3.4 Příprava standardů.

		Příprava standardů		
Zkumavka č.	Hmotnostní koncentrace BSA c_{BSA} [µg/ml]	Objem vody V_V [µl]	Objem zásobního roztoku BSA V_{ZAS} [µl]	Celkový objem zkumavek V [µl]
N	blank			1000
1	2,5			1000
2	5,0			1000
3	7,5			1000
4	10,0			1000
5	12,5			1000
6	15,0			1000
7	17,5			1000
8	20,0			1000
9	22,5			1000
10	25,0			1000
11	?	/	/	1000

Pozn. Zkumavka s číslem 11 je slepý vzorek, který je žákovi předán vyučujícím.

5. Do všech zkumavek přidejte 2 ml činidla Bradfordové a rychle promíchejte jejich obsah.

- Vzorky nechte 5 minut odpočívat. Pomocí spektrofotometru změřte absorbance vzorků při vlnové délce 595 nm (začněte blankem, aby se přístroj vynuloval). Výsledky si zaznamenejte.
- Dopočítejte propustnost (transmitanci), směrnici kalibrační přímky, kalibrační faktor a koncentraci BSA ve zkumavkách. U neznámého vzorku použijte vzorec:

$$c_x = c_{st} \times \frac{A_x}{A_{st}}, \quad (3.3.1),$$

poté dopočítejte naměřené koncentrace všech vzorků dle vzorce:

$$c_x = F \times A_x, \quad (3.3.2).$$

Výsledky uveďte v tabulce (Tabulka 3.5).

- V závěru nezapomeňte uvést výslednou hmotnostní koncentraci slepého vzorku zadaného vyučujícím.

Tabulka 3.5 Rozbor kalibračního grafu a jednotlivých vzorků.

Zkumavka č.	Absorbance A_x [–]	Transmitance T [–]	Směrnice přímky k [–]	Koncentrace c_{BSA} [μl/ml]	Koncentrace c_x [μl/ml]
N	/	/		blank	0
1				2,5	
2				5,0	
3				7,5	
4			Kalibrační faktor F [–]	10,0	
5				12,5	
6				15,0	
7				17,5	
8				20,0	
9				22,5	
10				25,0	
11				?	

Výsledky

Kontrolní otázky

- Co je to blank?
- Uveďte alespoň tři metody, které se dají použít ke stanovení proteinů, stručně popište.
- Uveďte hlavní funkce proteinů, alespoň 5.
- U kterého zkoumaného vzorku (1–10) byla absorbance nejvyšší a proč?

Závěr

Použitá literatura

[5], [14], [24], [25] a [27].

3.4 Identifikace lipidů

Cíl úlohy

Prostřednictvím této úlohy se naučíte:

- Pracovat s jednoduchým chemickým vybavením a mikroskopem.
- Extrahovat lipidy ze vzorků a provádět hydrolýzu lecitinu.

Zadání

1. Provedte extrakci lipidů a průkaz lecitinu z vaječného žloutku.
2. Pomocí Liebermannova-Burchardova testu dokažte přítomnost cholesterolu ve žloutku.
3. Provedte hydrolýzu lecitinu.

Použité vybavení

Pomůcky:

- sada zkumavek
- ochranné pomůcky a rukavice (postupy obsahují nebezpečné a toxické látky)
- držák na zkumavky
- stojan (na filtrační aparaturu)
- filtrační kruh
- nálevka a filtrační papírky
- kádinka
- pipeta
- kahan
- podložní sklíčko
- univerzální indikátorové papírky
- laboratorní váha
- mikroskop

Chemikálie a látky:

- aceton (CH_3COCH_3)
- chloroform (CHCl_3) či 1,2-dichlorethan
- ethanol
- uvažené vajíčko
- acetanhydrid kyseliny octové
- kyselina octová (CH_3COOH)
- kyselina sírová (H_2SO_4)
- lecitin
- 10% vodný roztok NaOH
- Lugolův roztok (10 g KI a 5 g jódu se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml)
- 2% reineckát amonný (200 mg reineckátu v 10 ml vody)

Teoretický rozbor

Pro lipidy se v češtině obecně užívá název tuky, prakticky to však není zcela přesné, neboť tuky jsou pouze jednou, přestože významnou, podskupinou lipidů. Lipidy jsou organické sloučeniny *rostlinného, živočišného nebo mikrobiálního původu*. Podle původu se odlišuje jejich složitost a funkce. Lipidy jsou velice důležitou součástí správného fungování organismu. Jedná se konkrétně o funkce:

- **strukturní** (součást biologických membrán)
- **regulační** (steroidní hormony, vitaminy A, D, E a K atd.)
- **ochranná** (obal některých orgánů, např. ledvin)
- **tepelně izolační** (podkožní tuk)

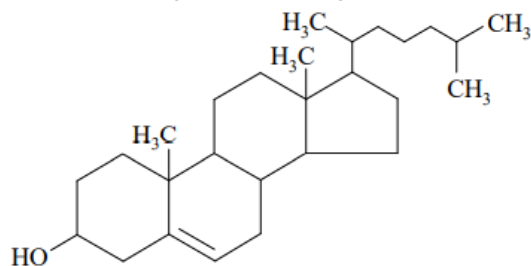
Lipidy mohou zároveň fungovat jako rozpouštědla pro určité lipofilní látky. Jsou to však ve vodě nerozpustné látky, naopak jsou rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (chloroformu). Lipidy se skládají z esenciálních mastných kyselin, které tělo musí přijímat v potravě. Mastné kyseliny se dělí na *nasycené* (neobsahují dvojné vazby) a *nenasycené* (obsahují jednu či více dvojných vazeb).

Lipidy dále dělíme na *homolipidy* a *heterolipidy*. **Homolipidy** neboli jednoduché lipidy, tvoří dvě podskupiny: *tuky a oleje*, což jsou estery vyšších karboxylových kyselin a trojmocného alkoholu glycerolu, a druhou skupinou jsou potom *vosky*, chemicky estery vyšších alifatických kyselin a alkoholů. **Heterolipidy** neboli složené lipidy (někdy nazývané i lipoidy), u nichž se v molekule nalézá část nepatřící přímo k lipidům (fosfolipidy, glykolipidy).

Lipidy mají obrovský význam pro člověka, jelikož jsou součástí hormonů, enzymů či důležitých vitamínů. Např. ze speciální skupiny tzv. gangliosidů je tvořena šedá kůra mozková a jejich přítomnost hraje velkou roli při zachycení virových částic pronikajících do buněk. Lipidy jsou také obsaženy v plazmě, kde tvoří lipoproteiny. Problematika poruch lipidového metabolismu je v popředí zájmu v souvislosti s prevencí a léčbou kardiovaskulárních onemocnění. Více v Dodatek C. Lipidy

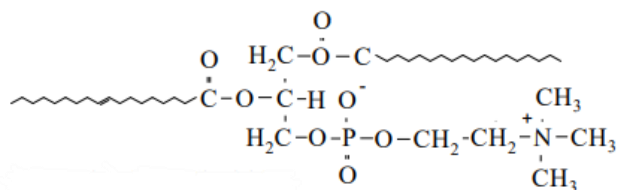
Vaječný žloutek obsahuje jak proteiny, tak i lipidy. Významnou součástí vaječného žloutku, stejně jako např. krve, je cholesterol, který se vyskytuje volný, ale také vázaný ve formě esteru. Barva vaječného žloutku je dána přítomností β -karotenu. Základním principem identifikace lipidů je jejich rozpuštění v příslušném organickém rozpouštědle a oddělení pevných zbytků filtrací. Vzniká tak nažloutlý průhledný roztok, který obsahuje extrahované lipidy. Pokud je při metodě získávání extraktu použit aceton, dojde k vysrážení lecitinu obsaženého ve žloutku. Lecitin je v acetonu nerozpustný, na rozdíl od ostatních lipidů.

Přítomný cholesterol lze dokázat pomocí **Liebermannova-Burchardova testu**, kdy v přítomnosti cholesterolu, který je obsažen ve vaječném žloutku, lze pozorovat vznik modrozeleného zbarvení. Vznik zeleného zbarvení v přítomnosti cholesterolu je způsoben narušením skeletu molekuly a vznikem produktu, který se projevuje zeleným zbarvením. Při vyšší koncentraci cholesterolu přechází zbarvení v temně zelené až tmavě modré (např. u žloutku). Pokud by bylo výsledné zbarvení testu hnědé, jednalo by se o lipid rostlinného původu.



Obrázek 3.7 Strukturní vzorec cholesterolu [5].

Molekula lecitinu složená z objemné hydrofobní části řetězců mastných kyselin a malé hydrofilní části fosfátu a amoniové skupiny tvoří v přítomnosti vody krystalické shluky koloidních rozměrů. Lecitin lze rozštěpit hydrolýzou na vyšší mastné kyseliny, glycerol, kyselinu fosforečnou a dusíkatou organickou bázi. Tyto složky lze v hydrolyzátu dokázat. Mastné kyseliny jako mýdla, glycerol reakcí nitrochromovou a kyselinu fosforečnou jako žlutý fosfomolybdenan amonný, který po redukci poskytne modré zbarvení fosfomolybdenové modře (princip kvantitativního stanovení fosfátů podle Fiske-Subbarowa). Cholin dává s přebytkem jodu málo rozpustnou sloučeninu (**Florenceovy krystalky**). V této práci bude provedena pouze hydrolýza lecitinu a následný důkaz cholinu. Cholin tvoří v přítomnosti Lugolova roztoku hnědé krystalky. V přítomnosti reineckátu amonného za růžové krystalky reineckátu cholinu. Tyto krystalky jsou viditelné pod mikroskopem.

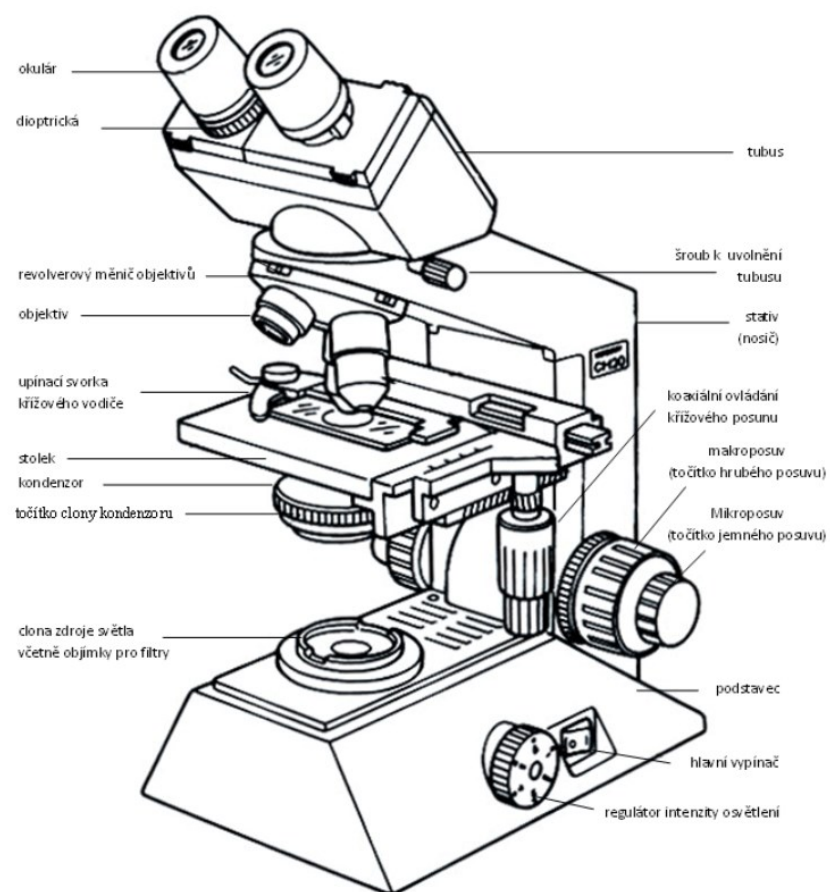


Obrázek 3.8 Strukturní vzorec lecitinu [5].

Optický mikroskop je mikroskop, v němž je obraz zvětšován dvěma sadami spojných čoček: objektivem a okulárem. V biologii se pro účely optické mikroskopie užívají objektivy různé síly, tj. různé zvětšovací schopnosti. Okulár pouze zvětšuje obraz vržený objektivem. Na objektivu je vždy uvedeno zvětšení (Z). Pomocí zvětšení je možné dopočítat ohniskovou vzdálenost, což je vzdálenost čočky od ohniska. Ohnisko je bod, ve kterém se sbíhají všechny světelné paprsky.

$$Z = 250/f, \quad (3.4.1)$$

kde Z značí zvětšení objektivu, f je značení ohniskové vzdálenosti v milimetrech a číslo 250 udává konvenční pracovní vzdálenost lidského oka také v mm.



Obrázek 3.9 Schéma optického mikroskopu [31].

Pracovní postup

Postup k bodu č. 1 zadání: Extrakce lipidů a průkaz lecitinu

1. Odeberte vzorek uvařeného žloutku vajíčka (1/5 žloutku) a vložte ho do připravené zkumavky.
2. Do zkumavky přidejte aceton tak, aby byl žloutek ponořen celým svým objemem (asi 25 ml). Obsah zkumavky promíchejte.
3. Dále přidejte do zkumavky zhruba stejné množství chloroformu (25 ml). Opět promíchejte a nechte obsah zkumavky alespoň 5 minut odpočívat.
4. Mezitím si připravte stojan. Připevněte na něj filtrační kruh. Do kruhu vložte nálevku. Pod nálevku umístěte kádinku tak, aby do ní nálevka přímo ústila. Do nálevky vložte filtrační papír.
5. Provedte filtraci obsahu zkumavky přes připravenou aparaturu. Výsledný extrakt v kádince uchovejte pro následující postupy.
6. Do druhé zkumavky vložte uvařený žloutek (1/5 žloutku), přidejte 15 ml horkého ethanolu a nechte vychladnout.
7. Provedte filtraci této směsi pomocí sestavené filtrační aparatury.
8. Do další prázdné zkumavky si připravte 2–3 ml acetonu. Postupně přikapávejte filtrát. Následný zákal filtrátu způsobuje vysrážení lecitinu, důkaz lecitinu.

Postup k bodu č. 2 zadání: Liebermann-Burchardův test

1. Pomocí pipety připravte do zkumavky 10 kapek získaného extraktu z předchozího postupu.
2. Následně přidejte 3 kapky acetanhydridu. Promíchejte.
3. Nakonec přidejte kapku koncentrované kyseliny sírové. Postupujte velice opatrně, jelikož se jedná o silnou kyselinu! Obsah zkumavky promíchejte.
4. Do protokolu přidejte fotografii výsledného zbarvení směsi ve zkumavce a v závěru zhodnoťte.

Postup k bodu č. 3 zadání: Hydrolýza lecitinu

1. Na dno zkumavky vložte přiměřené množství surového lecitinu.
2. Přidejte 5 ml 10% vodného roztoku NaOH. Zhruba 15 minut zahřívejte nad kahanem.
3. Hydrolyzát ochlaďte.
4. Pomocí kyseliny octové okyselte obsah na výsledné pH 6, kontrolujte pomocí univerzálních indikátorových papírků.
5. Stejně jako v předchozím postupu přefiltrujte získaný hydrolyzát.
6. Na podložní sklíčko dejte 1 kapku hydrolyzátu a 1 kapku Lugolova roztoku. Sledujte pod mikroskopem, výsledek zakreslete a zaznamenejte do protokolu.
7. Na nové podložní sklíčko dejte 2 kapky hydrolyzátu a 1 kapku 2% reineckátu amonného. Sledujte pod mikroskopem a uveďte výsledné zbarvení látky.

Výsledky

Kontrolní otázky

1. Při hydrolýze jste použili princip alkalické či kyselé hydrolýzy? Zdůvodněte.
2. Jsou lipidy rozpustné ve vodě? Který hlavní lipid obsažen ve vaječném žloutku není rozpustný v acetonu?
3. Jaká je ohnisková vzdálenost u mikroskopů používajících zvětšení v rozmezí 40x až 100x?
4. Jaký je význam identifikace lipidů v lékařství? Jaký mají lipidy význam pro člověka?

Závěr

Použitá literatura

[4], [5] a [11].

3.5 Enzymové reakce na pH

Cíl úlohy

Prostřednictvím této úlohy se naučíte:

- Procvičit si základní laboratorní dovednosti používané při práci s enzymy.
- Provést jednoduché metody detekce enzymových aktivit.

Zadání

1. Připravte potřebný enzym, substrát a pufr dle postupu.
2. Zjistěte optimální pH enzymové reakce α -amylázy.

Použité vybavení

Pomůcky:

- sada zkumavek
- pipeta
- laboratorní váha
- kahan
- držák na zkumavky
- vodní lázeň
- porcelánová destička
- stopky

Chemikálie a látky:

- sliny
- fyziologický roztok (0,9% NaCl)
- Lugolův roztok (10 g KI a 5 g jódu se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml)
- škrob
- hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)
- kyselina citronová

Teoretický rozbor

Kdyby nebyly přítomny látky umožňující (urychlující) průběh reakcí metabolismu v podmínkách organismu (teplo, tlak, vodné prostředí), reakce by probíhaly pomalu či by neprobíhaly vůbec. Enzymy jsou bílkoviny se specifickou strukturou a mají funkci právě biokatalyzátoru, tedy urychlovače metabolických reakcí. Chemicky se vážou se substráty vstupujícími do reakce za vzniku přechodného komplexu (sloučeniny). Katalyzátory snižují aktivační energii, kterou molekuly reagujících látek potřebují k uskutečnění reakce. Základní rozdíl mezi enzymy a ostatními katalyzátory spočívá v tom, že svou specifickou strukturou chemické reakce nejen urychlují, ale zároveň je regulují a přímo se jich účastní.

Účinnost jednotlivých enzymů závisí na jejich aktivitě. Enzymová aktivita je velice citlivá na změnu pH. Ve skutečnosti je většina proteinů aktivních jen v rozmezí pH mezi 5–9. Dále ji ovlivňuje také koncentrace substrátu, teplota a přítomnost aktivátorů a inhibitorů.

Enzymy jsou významnou součástí trávení, jelikož ovlivňují rychlost trávení a funkčnost trávicího traktu. K enzymům trávicího traktu řadíme:

- lipidy – žaludeční a pankreatické lipázy, pankreatické fosfolipázy
- sacharidy – amylázy (škrob, glykogen), sacharóza, isomaltóza, laktáza
- bílkoviny – pepsin, chymosin, trypsin, elastáza, karboxypeptidáza, aminopeptidáza
- nukleonové kyseliny – ribonukleáza, deoxyrybonukleáza

Vnější podmínky, ve kterých reakce probíhají, ovlivňují jejich rychlost. Největší vliv má množství substrátu, s vyšší koncentrací klesá reakční doba. Rychlost reakcí také roste přímo úměrně s množstvím enzymu. Pro tuto úlohu je nejpodstatnější závislost na pH prostředí, jelikož pH oblast s vysokou účinností enzymu je velice úzká.

Důležitým enzymem pro lidský organismus je α -amyláza. Ta je obsažená ve slinách, odbourává škrob za vzniku dextrinů (nízkomolekulárních polysacharidů). Enzym katalyzuje štěpení α -1,4-glykosidické vazby uvnitř sacharidů, které obsahují 3 a více D-glukózových jednotek (oligosacharidy). Štěpení v řetězci probíhá náhodně a produktem štěpení jsou redukující sacharidy maltóza, maltotrióza a dextriny. α -amyláza nekatalyzuje štěpení škrobu až na glukózové jednotky a ve své molekule obsahuje vázaný iont vápníku. Přestože je vápník nutný pro enzymatickou aktivitu α -amylázy, jeho příliš vysoká koncentrace může enzym inhibovat (zpomalovat). pH optimum α -amylázy je v rozmezí pH 7,0–7,2.

Princip využití v této úloze: Lugolův roztok je možné využít k detekci přítomnosti škrobu. Při reakci škrobu s Lugolovým činidlem dochází ke vzniku modrého zbarvení. Při štěpení škrobu na kratší řetězce přechází modré zbarvení nejprve do červené barvy, po úplném rozštěpení škrobu může dojít ke žlutému zbarvení.

Pracovní postup

Postup k bodu č. 1 zadání: Příprava enzymu, substrátu a pufrů

1. Připravte si 1 ml vlastních slin a smíchejte ho se 2 ml vody v první zkumavce (dávkování doporučeno pipetou). Takto získáte enzym α -amylázy.
2. Dále připravte roztok škrobu, substrát. V 50 ml destilované vody povařte 0,5 g škrobu.
3. Do sady 11 čistých a předem označených zkumavek napipetujte roztok hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4) a kyseliny citronové. Takto získáte sadu pufrů k následné analýze.

Tabulka 3.6 Příprava jednotlivých pufrů.

Zkumavka č.	Na_2HPO_4 [ml]	Kyselina citronová [ml]	pH [-]
N	0	4	blank
1	0,8	3,2	3
2	1,4	2,6	4
3	2	2	4,8
4	2,25	1,75	5,4
5	2,4	1,6	5,8
6	2,9	1,1	6,6
7	3,3	0,7	7
8	3,75	0,25	7,6
9	3,9	0,1	8
10	4	0	8,3

Postup k bodu č. 2 zadání: Optimální pH enzymové reakce α -amylázy

1. Odměřte 1 ml připraveného enzymu α -amylázy a doplňte jej do 25 ml fyziologickým roztokem v odměrné kádince.
2. Do všech zkumavek s připravenými pufrů v rozsahu 3 až 8,3 pH přidejte 1 ml substrátu a 1 ml roztoku α -amylázy (bod 1.).
3. Vzorky nechte ideálně 15 minut inkubovat v prostředí o teplotě 30 °C (či 10 minut, teplota 37 °C).
4. Na porcelánovou destičku napipetujte 2 kapky Lugolova roztoku.
5. Připravte si stopky a pipetu na nabírání vzorku ze zkumavky.
6. Naberte kapku ze zkumavky č. 7 a napipetujte ji na porcelánovou destičku k Lugolovu roztoku. Spusťte stopky a po minutě přidejte další kapku. Tento postup opakujte, dokud se směs na destičce nezbarví do modra. Poté запиšte do tabulky (
7. Tabulka 3.7) čas, po kterém došlo k zabarvení.
8. Postup opakujte u všech zkumavek a výsledky uveďte v tabulce (
9. Tabulka 3.7). Výsledky vynesete do konečného grafu t(pH).
10. V tabulce vyznačte optimální reakční pH α -amylázy, zdůvodněte. Uveďte předpokládané pH slepého vzorku, blanku.

Tabulka 3.7 Reakce α -amylázy.

Zkumavka č.	pH [-]	t_{REAKCE} [min]
N	blank	
1	3	
2	4	
3	4,8	
4	5,4	
5	5,8	
6	6,6	
7	7	
8	7,6	
9	8	
10	8,3	

Výsledky

Kontrolní otázky

1. Kde všude v lidském těle je enzym α -amylázy tvořen?
2. Jaké má tento enzym funkce?
3. Uveďte další příklady enzymů a jejich funkci.

Závěr

Použitá literatura

[5], [11], [16], [28] a [29].

4 Výsledky realizovaných úloh

4.1 Úloha: Identifikace aminokyselin

Výsledky

1. Ninhydrinová metoda

Tabulka 4.1 Hotový výpočetní rozbor roztoků a vzorků.

	Počáteční roztok			Roztok ve zkumavkách	Rozbor vzorků	
	Hmotnostní zlomek (koncentrace v roztoku) w [%]	Hmotnost vzorku $m(s)$ [g]	Hmotnost rozpouštědla (vody) $m(r)$ [ml]	Hmotnostní zlomek (koncentrace) w_{ZK} [%]	Molární hmotnost M [g/mol]	Látkové množství n [mmol]
Alanin	2	2,04	100	1	89,10	0,22
Tyrosin	0,1	0,10	100	0,05	181,19	0,01
Glycin	2	2,04	100	1	75,07	0,27
Vaječný Albumin	2	2,04	100	1	/	/
Ninhydrin	0,2	0,20	100	/	178,14	/

Výpočty k tabulce:

$$w = \frac{m(s)}{m(r) + m(s)} \times 100 \Rightarrow m(s) = \frac{w \times m(r)}{(100 - w)} = \frac{2 \times 100}{100 - 2} \cong \mathbf{2,04\ g}$$

Celková hmotnost roztoku: $m(c) = m(r) + m(s) = 102,4\ g(ml)$

(do zkumavky však přijde jen 1 ml vzorku) $\Rightarrow m(c) \times x = 1\ ml \Rightarrow x = \frac{1}{102,4} = 0,0098$

Množství aminokyseliny ve zkumavce je tedy: $m_{ZK}(s) = m(s) \times 0,0098 = 2,04 \times 0,0098 = 0,02\ g$

Smícháme 1 ml roztoku aminokyseliny a 1 ml ninhydrinu, Celková hmotnost roztoku ve zkumavce:

$m_{ZK}(c) = 2\ ml$

$$m_{ZK}(r) = m_{ZK}(c) - m_{ZK}(s) = 2 - m_{ZK}(s)$$

$$w_{ZK} = \frac{m_{ZK}(s)}{m_{ZK}(s) + [2 - m_{ZK}(s)]} \times 100 = \frac{0,02}{0,02 + (2 - 0,02)} \times 100 = \mathbf{1\ \%}$$

$$M_{C_3H_7NO_2} = 3 \times A_C + 7 \times A_H + A_N + 2 \times A_O = 3 \times 12,01 + 7 \times 1,0079 + 14,01 + 2 \times 16 =$$

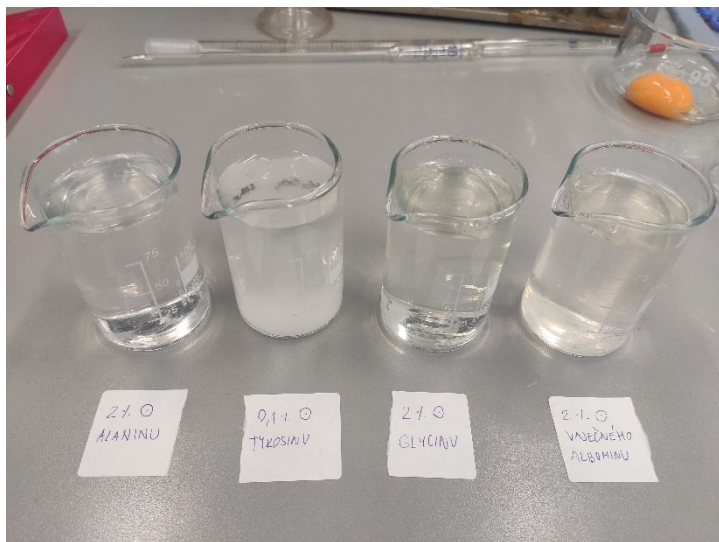
89,10 g/mol

$$M_{C_3H_7NO_2} = \frac{m_{ZK}(s)}{n} \Rightarrow n = \frac{m_{ZK}(s)}{M_{C_3H_7NO_2}} = \frac{0,02}{89,0953} = 2,245 \times 10^{-4}\ mol = \mathbf{0,22\ mmol}$$

Roztoky byly připravovány dle zadání do 100 ml rozpouštědla (vody). Dle zadání byly dopočítány hmotnosti a další údaje jednotlivých vzorků ve zkumavkách. K odvážení jednotlivých vzorků byla použita laboratorní váha typu OHAUS Scout.



Obrázek 4.1 Laboratorní váha OHAUS Scout (https://www.labicom.cz/cogwpspgd/uploads/2016/09/Scout-SKX_DS_CZ.pdf).



Obrázek 4.2 Připravené roztoky jednotlivých aminokyselin.

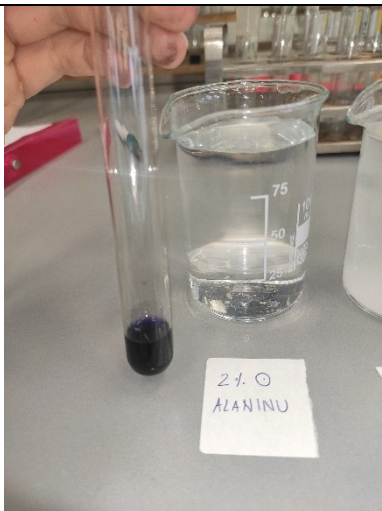
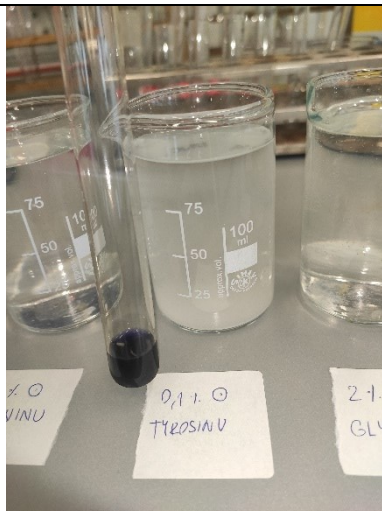
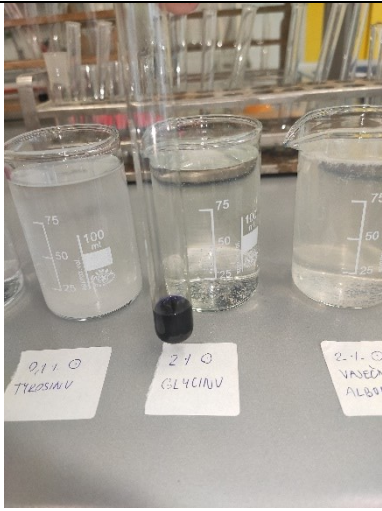
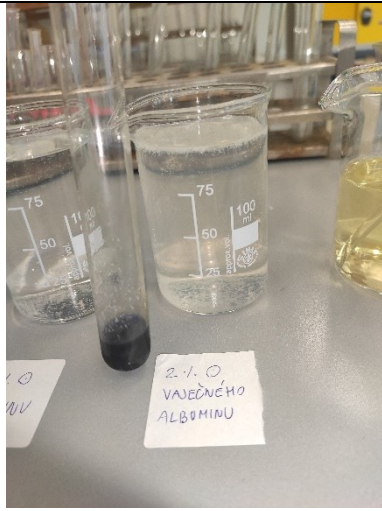


Obrázek 4.3 Ninhydrinový roztok (0,2%).



Obrázek 4.4 Zahřívání zkumavek obsahujících 1 ml roztoku ninhydrinu a 1 ml roztoku zkoumaných vzorků aminokyselin.

Tabulka 4.2 Fotodokumentace výsledného zbarvení vzorků aminokyselin.

1. Zkumavka – Výsledné zbarvení alaninu.	2. Zkumavka – Výsledné zbarvení tyrosinu.
	
3. Zkumavka – Výsledné zbarvení glycinu.	4. Zkumavka – Výsledné zbarvení vaječného albuminu.
	

U všech zkoumaných aminokyselin došlo k charakteristickému modrofialovému zbarvení v reakci s ninhydrinem. Vznikla tak tedy typická Ruhemanova violeť. Pokud bychom však bývali zařadili do úlohy např. vzorek prolinu, bylo by zbarvení odlišné, do žluta.

2. TLC chromatografie

Tabulka 4.3 Získané retenční faktory a izoelektrické body.

	Tabulkový R_F [-]	a [mm]	b [mm]	Získaný R_F [-]	pI [-]
Alanin	0,3	48	13	0,27	6,11
Tyrosin	0,55	47	21	0,45	5,66
Glycin	0,25	47	11	0,23	6,07

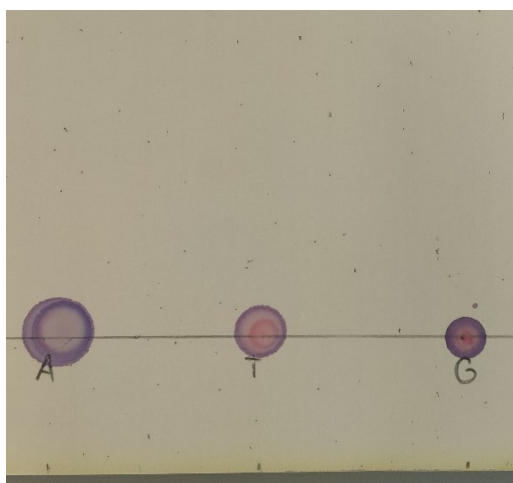
Výpočty k tabulce:

$$R_f = \frac{b}{a} = \frac{13}{48} = 0,27$$

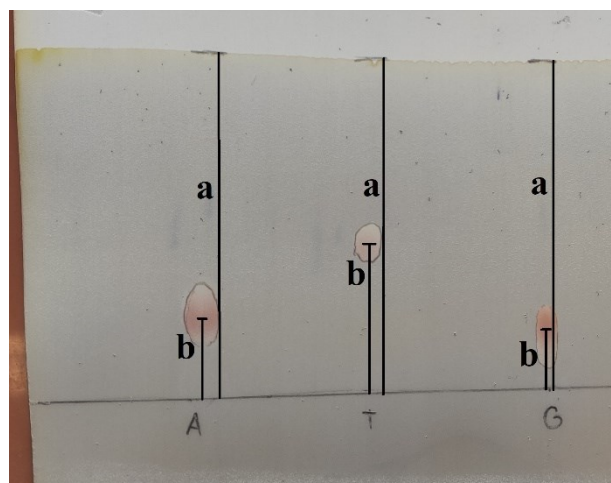
$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2,35 + 9,87}{2} = 6,11$$



Obrázek 4.5 Butanol neboli n-butylalkohol a koncentrovaná kyselina octová na tvorbu mobilní fáze (vlevo).
Probíhající metoda TLC: Silufolová deska vložená do vyvíječící komory s mobilní fází (vpravo).



Obrázek 4.6 Vzorky na TLC destičce. A značí alanin, T značí tyrosin a G je glycin.



Obrázek 4.7 Vyznačení skvrn a čela po TLC metodě. Zvýraznění délek a, b.

Kontrolní otázky

- 1. Jak se zabarví obsah zkumavky v přítomnosti prolinu po provedení ninhydrinové reakce a proč?**
V přítomnosti prolinu se obsah zkumavky po provedení ninhydrinové reakce barví do žluta. Je tomu tak, jelikož prolin, na rozdíl od ostatních α -aminokyselin, obsahuje iminovou skupinu.
- 2. Který zkoumaný vzorek aminokyseliny měl největší izoelektrický bod a co nám tento bod udává?**
Největší izoelektrický bod měl alanin, zároveň se jeho pH nejvíce blíží hodnotě neutrálního pH. Izoelektrický bod nám udává hodnotu pH, při které je celkový elektrický náboj molekuly roven nule.
- 3. K čemu slouží retenční faktor a jak ho vypočítáte?**
Retenční faktor se používá k vyhodnocení chromatografických metod. Hodnotí migrační chování jednotlivých látek, přičemž je pro ně specifický. Čím větší je retenční faktor, tím vyšší je migrační chování látky.
- 4. Kolik znáte proteinogenních aminokyselin a jak lze aminokyseliny obecně klasifikovat/dělit?**
Celkem známe 20 proteinogenních aminokyselin, přičemž selenocystein či pyrrolisin jsou považovány za 21. a 22. proteinogenní aminokyselinu. Aminokyseliny lze klasifikovat na α -aminokyseliny, β -aminokyseliny a γ -aminokyseliny podle umístění karboxylové skupiny. Lze je také dělit na esenciální, semiesenciální nebo neesenciální aminokyseliny.

Závěr

V této úloze jsem použila základní metody k identifikaci aminokyselin. Nejdříve jsem pomocí ninhydrinové metody ověřila přítomnost aminokyselin ve vytvořených roztocích, vznikla Ruhemanova violeť. Tohoto výsledku bylo dosaženo zahříváním roztoků aminokyselin s roztokem ninhydrinu, viz Tabulka 4.2. Zároveň jsem prokázala, že ani jedna z uvedených aminokyselin nebyl prolin, jelikož ten by ninhydrin zabarvil do žluta. Kromě provedení reakce jsem si také procvičila chemické výpočty, kdy jsem zjišťovala přesnou hmotnostní koncentraci aminokyselin ve zkumavkách. U alaninu, glycinu a albuminu byla koncentrace ve zkumavce asi 1 %, u tyrosinu pouze 0,05 %. Dále jsem dopočítala molární hmotnosti vzorků a jejich látkové množství.

V druhé části úlohy jsem provedla metodu chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Metodu jsme realizovala u vzorků alaninu, glycinu a tyrosinu. U všech jsem metodou ověřovala retenční faktory. Retenční faktor alaninu byl 0,27. Retenční faktor tyrosinu byl 0,45. Poslední glycin měl naměřený retenční faktor 0,23. Celkově se naměřené retenční faktory příliš nelišily od těch zadaných. Případná odchylka mohla vzniknout při zakreslení středu skvrny či jiných přípravných procesech metody. Nakonec jsem u všech vzorků dopočítala izoelektrický bod, viz Tabulka 4.3.

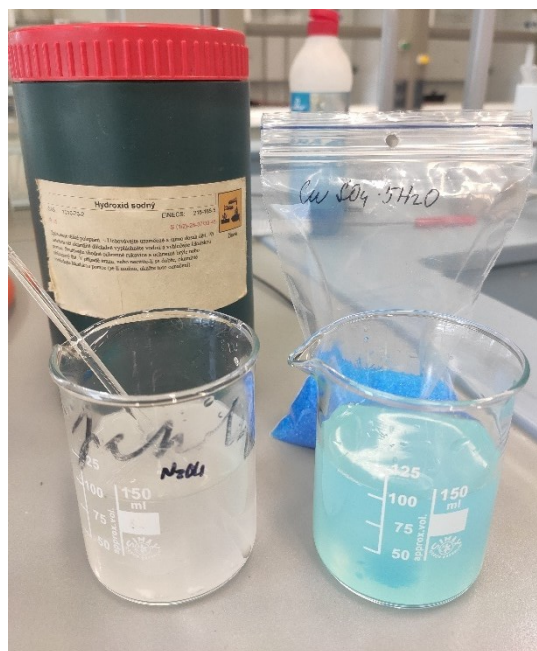
4.2 Úloha: Stanovení proteinů

Výsledky

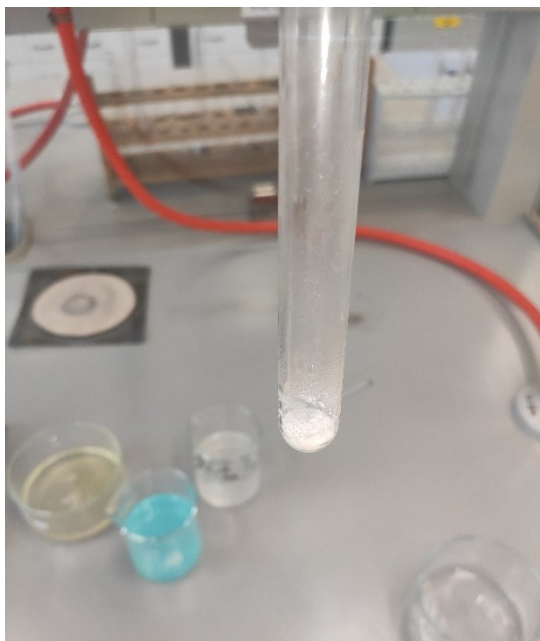
1. Biuretová metoda



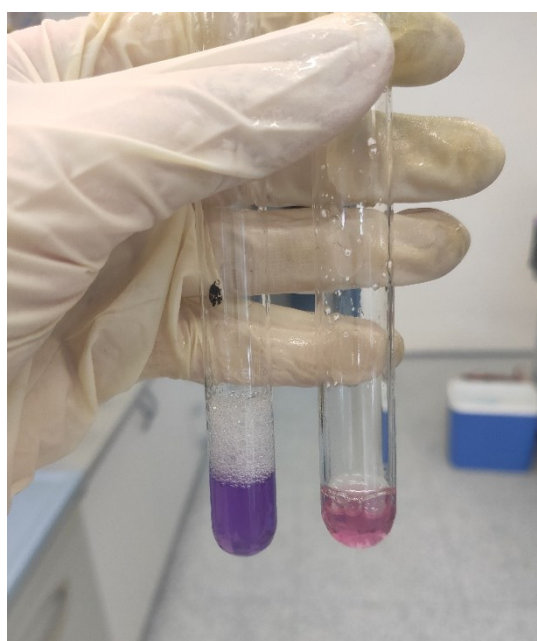
Obrázek 4.8 Roztok bílkovin a krystalky močoviny.



Obrázek 4.9 Roztoky NaOH a CuSO_4 .



Obrázek 4.10 Ztuhnutí získaného biuretu.



Obrázek 4.11 Konečné zbarvení roztoku bílkovin (vlevo), konečné zbarvení biuretu (vpravo).

Zbarvení se liší nejen kvůli rozdílné koncentraci bílkovin ve vzorcích, ale také kvůli odlišným vlastnostem těchto dvou vzorků. Vzorky mají rozdílnou absorpci při ideální měrné vlnové délce 595 nm. Vzorek biuretu má spíše červenofialovou barvu.

2. Bradfordova metoda

Tabulka 4.4 Příprava standardů.

		Příprava standardů		
Zkumavka č.	Hmotnostní koncentrace BSA $c_{BSA} [\mu\text{g/ml}]$	Objem vody $V_V [\mu\text{l}]$	Objem zásobního roztoku BSA $V_{Z\acute{A}S} [\mu\text{l}]$	Celkový objem zkumavek $V [\mu\text{l}]$
N	blank	1000	0	1000
1	2,5	975	25	1000
2	5,0	950	50	1000
3	7,5	925	75	1000
4	10,0	900	100	1000
5	12,5	875	125	1000
6	15,0	850	150	1000
7	17,5	825	175	1000
8	20,0	800	200	1000
9	22,5	775	225	1000
10	25,0	750	250	1000
11	?	/	/	1000

Pozn. Zkumavka s číslem 11 je slepý vzorek, který je žákovi předán vyučujícím.

Výpočty k tabulce:

Koncentrace zásobního roztoku: $c_{Z\acute{A}S} = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 0,1 \frac{\text{g}}{\text{l}}$

Výsledná hmotnostní koncentrace: $c_{BSA} = 25 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 0,025 \frac{\text{g}}{\text{l}}$

Koncentrace vody: $c_V = 0 \mu\text{g/ml}$

Objem zkumavky: $V = 1 \text{ ml}$

$$V = V_v + V_{Z\acute{A}S} = \frac{(c_V \times V_v + c_{Z\acute{A}S} \times V_{Z\acute{A}S})}{c_{BSA}} \Rightarrow V = \frac{[c_V \times (1 - V_{Z\acute{A}S}) + c_{Z\acute{A}S} \times V_{Z\acute{A}S}]}{c_{BSA}}$$

$$V_{Z\acute{A}S} = \frac{V \times c_{BSA} - C_V}{C_{Z\acute{A}S} - C_V}$$

$$V_{Z\acute{A}S} = \frac{V \times c_{BSA} - C_V}{C_{Z\acute{A}S} - C_V} = \frac{1 \times 0,025 - 0}{0,1 - 0} = \mathbf{0,25 \text{ ml}}$$

$$V_v = V - V_{Z\acute{A}S} = 1 - 0,25 = \mathbf{0,75 \text{ ml}}$$

Měření absorbance vzorků hovězího albuminu o různých koncentracích, za přítomnosti Bradfordova činidla používaného ke kvalitativním měřením, bylo provedeno na spektrofotometru UV/VIS spektrofotometru BK-S380 od firmy Biobase. Jedná se o běžný spektrofotometr pracující na bázi ultrafialovo-viditelné spektroskopie. Do spektrofotometru byly vkládány kyvety s předem specifikovanou koncentrací vzorku.



Obrázek 4.12 UV/VIS spektrofotometr BK-S380. S Jedná se o přístroj poskytnutý oddělením centrálních laboratoří v Slezské nemocnici v Opavě (http://www.meihuatrade.com/sys_manager/Images/proImg/BK-S360BK-S380BK-S390%20SCANNING%20UVVIS%20SPECTROPHOTOMETER.jpg).

Spektrofotometr byl propojený s PC zařízením, jelikož postupy jsou v klinických laboratořích již plně automatizované. Pro zpracování dat ze spektrofotometru byl použit program UV Professional. Měření proběhlo podle pokynů poskytnutých k obsluze spektrofotometru a PC zařízení.

POSTUP

1. Zapni fotometr
2. Na PC s přihlášeným uživatelem **clab** klikni na ikonu **UV Profesional**
3. Přihlaš se jako uživatel **fotometr** s heslem **clab** → *Přihlásím do PC*
4. Do programu se přihlas pod svým **jménem** nebo jako **Administrator (clsnopava)**
5. Otevře se **NewFile** (mělo by být zaškrtnuté Wavelength Scan – OK)
6. Automaticky se otevře okno **Option**. Nastav parametry měření:

Rozsah absorbance (Scale Setup): závisí na zbarvení vzorku. TOP 0,5 zvyšovat v závislosti na intenzitě zbarvení. Hodnotu lze upravit i po měření. Pokud se zvyšuje, musí se znova změřit.

Rozsah vlnové délky (Wavelength x-direction): 380 – 700 nm

Interval: 1 nm

Rychlost měření (quick): můžeš upravit, ale ne zbytečně

Name: vyplnit identifikaci vzorku (datum, č.ž., jméno, RČ, ZP, oddělení)

Potvrď nastavení **OK**

7. Vlož do fotometru kyvetu s blankem (kyvetu vkládat vždy stejně, ▼ vlevo, pokresleným vpravo)
8. Při každé první měření je nutné nastavit Baseline (**Operate > Create System Baseline > Start**)

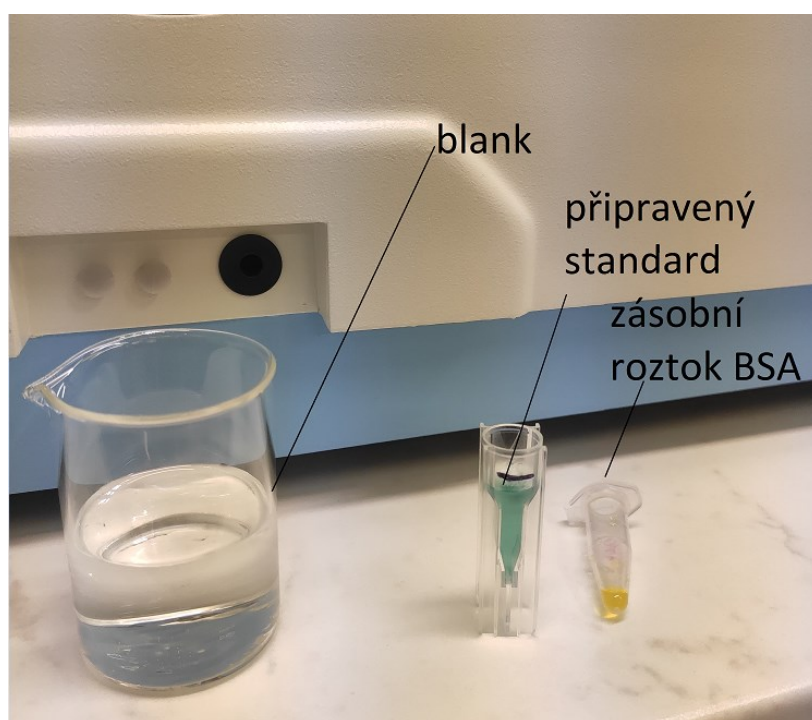
Na dotaz Create system baseline is OK klikni Save the rekord? **Ano**, ale navyš číslo o jednu (x+1), **Uložit**.

Uložit

Obrázek 4.13 1. až 8. bod k postupu měření absorbancí vzorků na spektrofotometru.

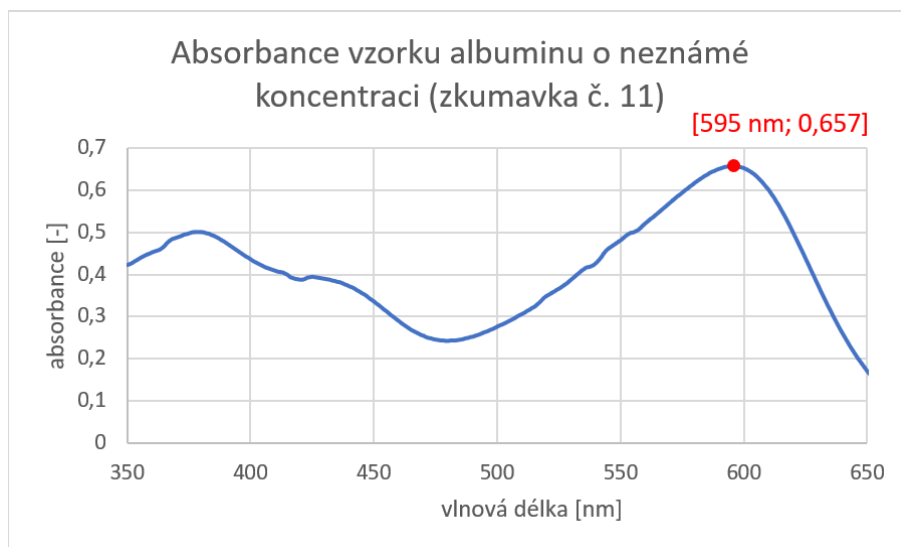
9. Změř Blank (**Operate > Set Blank**)
10. Vyměň blank za kyvetu se vzorkem a proveď analýzu (**Operate > Start Test**). Po dotazu Wavelength scan finished, save the record? Odpověz **Ne**
Nyní můžeš změnit rozsah absorbance (viz výše = Operate > Option > Scale SetUp) a vytvořit „hezčí“ obrázek (např. 0,500 → 0,050). Hodnotu lze upravit i po měření. Pokud se zvyšuje, musí se znova změnit
11. Výsledek ulož pomocí: **File > Output > Picture File (BMP format)**
Počítač > c:\ > **Fotometr**
RRRR_MM_DD_čč_Příjmení (Název souboru), uložit
12. Výsledek vytiskni:
Průzkumník souborů > Knihovny > Fotometr > příslušný název (otevřít), 2x klik
Vlevo nahoře **Tisk, Tisk**, odtrhni **Vyplnit snímek obrázkem**, vyber tiskárnu a vytiskni u statimového AU1, zavřít, Průzkumník souborů zavřít
13. Zavři UV Profesional
 1. Are you sure to QUIT the program? (opustit program) – **Ano**
 2. Are you sure to save the rekord? (uložit) - **Ne**
14. Vypni fotometr

Obrázek 4.14 9. až 14. bod k postupu měření absorbancí vzorků na spektrofotometru (12. bod nebyl proveden, jelikož byly všechny výsledky uloženy na flash disk).



Obrázek 4.15 Kádinka s vodou (blank), kyveta se standardem a roztok BSA (sérového hovězího albuminu).

Výsledná data z naměřených absorbancí jedenácti kyvet byla uložena do textových souborů a následně byla vynesena do grafu.



Graf 1: Absorpční křivka roztoku sérového albuminu o neznámé koncentraci. Maximální absorbance vzorku nastává při vlnové délce 595 nm.

Tabulka 4.5 Rozbor kalibračního grafu a jednotlivých vzorků při vlnové délce: $\lambda = 595 \text{ nm}$.

Zkumavka č.	Absorbance A_x [–]	Transmittance T [–]	Směrnice přímky k [–]	Koncentrace c_{BSA} [μl/ml]	Koncentrace c_x [μl/ml]
N	/	/	0,0385	blank	0
1	0,169	0,68		2,5	4,39
2	0,231	0,59		5,0	6,01
3	0,354	0,44		7,5	9,20
4	0,488	0,33	Kalibrační faktor F [–]	10,0	12,69
5	0,547	0,28		12,5	14,22
6	0,603	0,25		15,0	15,68
7	0,655	0,22	26,002	17,5	17,03
8	0,704	0,20		20,0	18,31
9	0,745	0,18		22,5	19,37
10	0,792	0,16		25,0	20,59
11	0,657	0,22		20,7	17,08

Výpočty k tabulce:

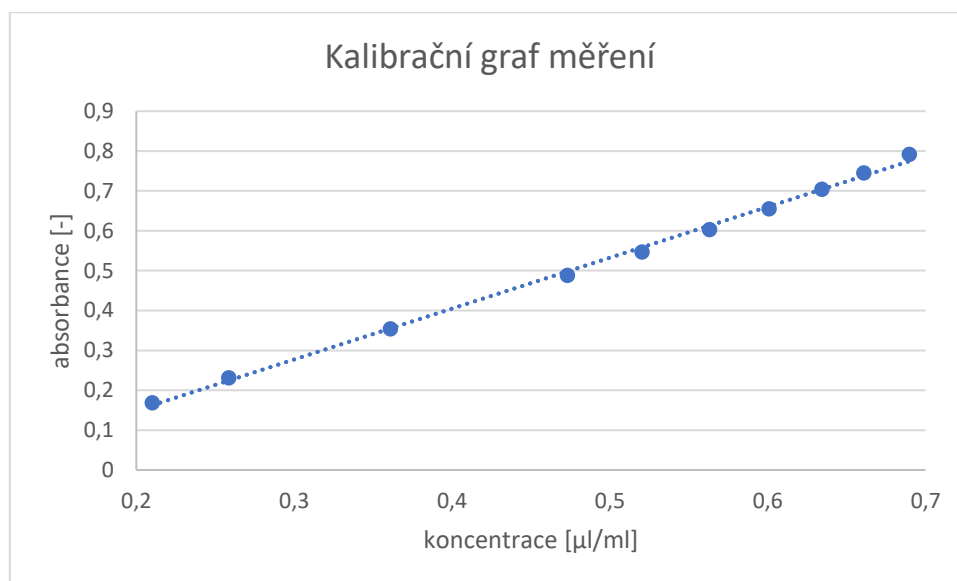
$$A_{11} = -\log(T) = \log\left(\frac{1}{T}\right) \Rightarrow T = \frac{1}{10^{A_x}} = \frac{1}{10^{0,657}} = 0,22 = 22 \%$$

$$c_{11BSA} = c_{10} \times \frac{A_{11}}{A_{10}} = 25 \times \frac{0,657}{0,792} = 20,7 \text{ μl/ml}$$

$$F = \frac{\sum c_{BSA}}{\sum A_{N-10}} = \frac{2,5 + 5,0 + 7,5 \dots}{0,169 + 0,231 + 0,354 \dots} = 26,002$$

$$k = \frac{1}{F} = \frac{1}{26,002} = 0,0385$$

$$c_{11(2)} = F \times A_{11} = 26,002 \times 0,657 = 17,08 \mu\text{l/ml}$$



Graf 2: Výsledná kalibrační křivka měření absorbance albuminu pomocí Bradfordovy metody.

Kontrolní otázky

1. Co je to blank?

Blank je tzv. čistý či prázdný vzorek, který se využívá ke slepé analýze. Před každým spektrofotometrickým měřením by měl být použit blank, používá se čistá voda, aby byla analýza následných vzorků správná.

2. Uveďte alespoň tři metody, které se dají použít ke stanovení proteinů, stručně popište.

Ke stanovení proteinů lze využít ninhydrinovou metodu, která na základě tvorby Ruhemanovy fialové prokáže přítomnost aminokyselin ve vzorku (prolin barví do žluta). Dále např. Hartree-Lowryho metoda, což je kolorimetrická metoda, která pracuje s měřením absorbance vzorků s intenzivním modrým zbarvením. Na obdobném principu pracuje metoda Bradfordové, která byla realizována v tomto protokolu. Na rozdíl od Hartree-Lowryho metody je však citlivější.

3. Uveďte hlavní funkce proteinů, alespoň 5.

Stavba a ochrana orgánů, transport důležitých látek v organismu, skladování zásob látek v organismu a např. katalýza chemických přeměn (enzymy).

4. U kterého zkoumaného vzorku (1–10) byla absorbance nejvyšší a proč?

Největší absorbance byla naměřena u vzorku 10, jelikož zde byla nejvyšší koncentrace albuminu. Látkou tedy prošla pouze malá část světla a větší část byla látkou v kvetě pohlcena.

Závěr

Biuretová reakce proběhla bez problému, jelikož výsledné fialové zbarvení nám prokázalo přítomnost proteinu ve vzorku vaječného bílku. V druhé části této úlohy byla realizována složitější metoda, ve které byl použit spektrofotometr. Byly naměřeny absorbance u všech roztoků o různých koncentracích a zároveň i u neznámého vzorku. Následně byly dopočítány důležité údaje a vynesena

kalibrační křivka měření. Absorbance neznámého vzorku při vlnové délce $\lambda = 595 \text{ nm}$, byla 0,657. Kalibrační faktor naměřených hodnot byl 26,002. Hodnota směrnice přímky byla 0,0385. Dle prvního výpočtu byla koncentrace neznámého vzorku asi 20,739 $\mu\text{l/ml}$. Podle druhého přesnějšího výpočtu byla koncentrace 17,083 $\mu\text{l/ml}$. Lze tedy tvrdit, že reálná koncentrace neznámého vzorku se pohybovala v rozmezí **17,08 – 20,7 $\mu\text{l/ml}$** . Dále byly vypočítány koncentrace všech vzorků z naměřených hodnot pomocí kalibračního faktoru. Výsledné koncentrace se od primárně uvedených koncentrací liší. Domnívám se, že nepřesnost měření byla způsobena při přípravě jednotlivých standardů, jelikož spektrofotometr by takto velkou odchylku nezpůsobil.

4.3 Úloha: Identifikace lipidů

Výsledky

1. Extrakce lipidů a průkaz lecitinu

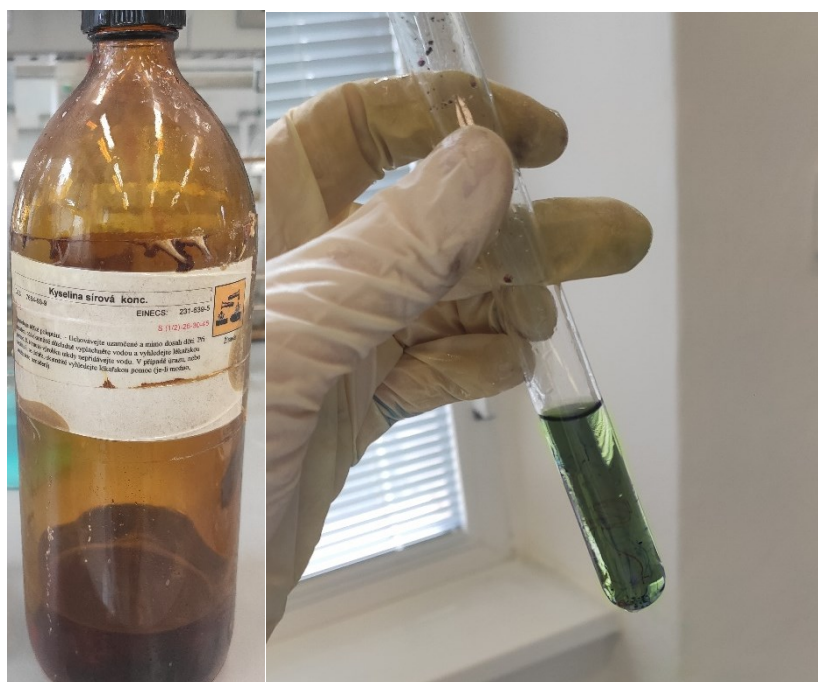


Obrázek 4.16 Vlevo: Vzorek uvařeného žloutku ve zkumavce smíchaný s acetonem a chloroformem. Vpravo: Sestavená filtrační aparatura s filtrovaným vzorkem.



Obrázek 4.17 Vlevo: Rozdílné zbarvení filtrátů. Kádinka vlevo obsahuje první filtrát žloutku v přítomnosti chloroformu a acetonu. Kádinka vpravo obsahuje filtrát žloutku s horkým ethanolem. Vpravo: Na dně zkumavky je vysrážený lecitin. K vysrážení (důkazu lecitinu) došlo po přidání 2 ml acetonu do filtrátu se žloutkem a horkým ethanolem.

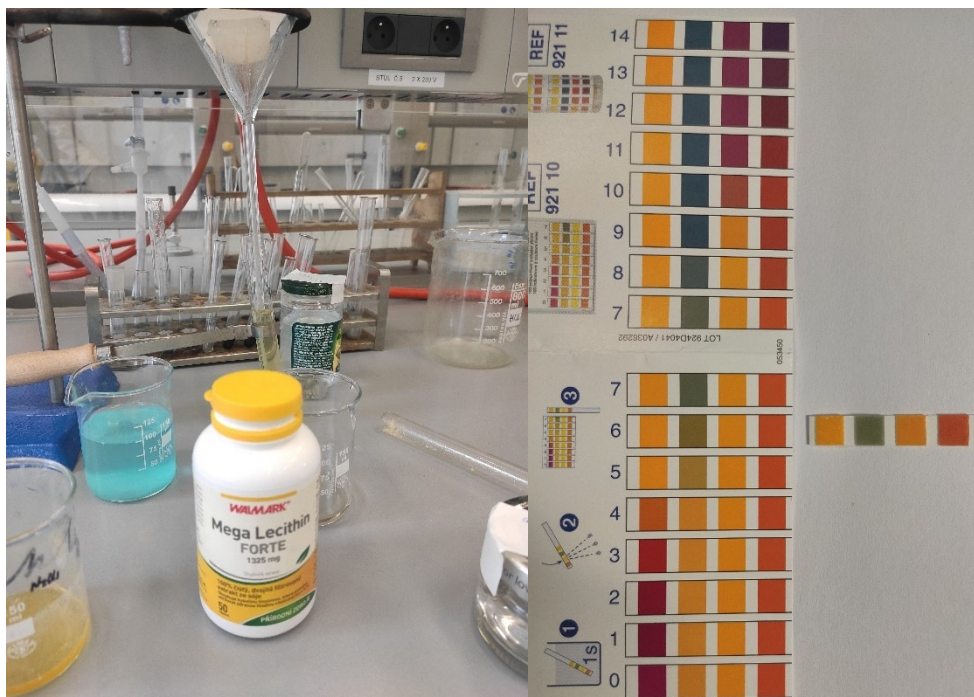
2. Liebermann-Burchardův test



Obrázek 4.18 Výsledné zbarvení filtrátu po přidání anhydridu kyseliny octové a koncentrované kyseliny sírové.

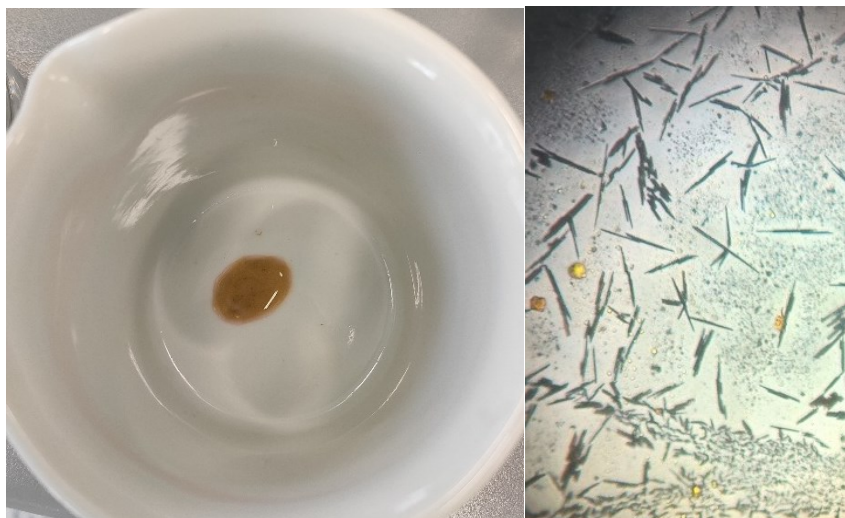
Výsledné zbarvení Liebermannova-Burchardova testu je pro uvařený žloutek zelené. Toto zbarvení je charakteristické pro živočišné lipidy. Prokázali jsme tak přítomnost cholesterolu v uvařeném žloutku.

3. Hydrolýza lecitinu



Obrázek 4.19 Vlevo: Filtrační aparatura na tvorbu filtrátu z hydrolyzátu surového lecitinu po zahřívání. Vpravo: Výsledný důkaz pH hydrolyzátu po okyselení kyselinou octovou. Výsledné pH hydrolyzátu je 6.

Po smíchání hydrolyzátu s kapkou Lugolova roztoku vznikají ve vzorku hnědé krystalky viditelné pod mikroskopem.



Obrázek 4.20 Vlevo: Zbarvení hydrolyzátu lecitinu v přítomnosti Lugolova roztoku. Vpravo: Krystalky vzniklé reakcí viditelné pod mikroskopem. Použité zvětšení: 100x.



Obrázek 4.21 Použitý mikroskop Biolux NV, firma Bresser.

Po přidání reineckátu amonného se výsledný hydrolyzát zbarvil do růžova. Hydrolyzou lecitinu a přidáním Lugolova roztoku s reineckátem amonným byl proveden důkaz cholinu. Krystalky cholinu jsou identifikovány jako důkaz přítomnosti lecitinu.

Kontrolní otázky

1. Při hydrolyze jste použili princip alkalické či kyselé hydrolyzy? Zdůvodněte.
Byl použit princip kyselé hydrolyzy. Na okyselení byla použita kyselina octová.
2. Jsou lipidy rozpustné ve vodě? Který hlavní lipid obsažen ve vaječném žloutku není rozpustný v acetonu?

Lipidy jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, jelikož voda se řadí k polárním rozpouštědlům, jsou ve vodě spíše nerozpustné či špatně rozpustné. V acetonu není rozpustný lecitin.

3. Jaká je ohnisková vzdálenost u mikroskopů používajících zvětšení v rozmezí 40x až 100x?

$$Z = \frac{250}{f} \Rightarrow f = \frac{250}{Z} = \frac{250}{40} = 6,25 \text{ cm}$$

$$f = \frac{250}{Z} = \frac{250}{100} = 2,5 \text{ cm}$$

Ohnisková vzdálenost u mikroskopů používajících zvětšení v rozmezí 40x až 100x je 2,5 až 6,25 cm.

4. Jaký je význam identifikace lipidů v lékařství? Jaký mají lipidy význam pro člověka?

Lipidy jsou zásobní a energeticky nejbohatší živinou pro lidský organismus. Dále jsou důležitými nosiči vitamínů, které jsou v nich rozpustné (A, D, E, K). V lékařství se musí sledovat např. krevní tuky. Nebezpečná je nadměra cholesterolu a dalších. Lipidy nebývají rozpustné ve vodě, musí se hlídat jejich množství. Hrozí např. ateroskleróza, ukládání tuků do cévních stěn.

Závěr

Extrakce lipidů a průkaz lecitinu proběhly bez problémů. Liebermann-Burchardův test s filtrátem žloutku proběhl dle očekávání. Jelikož se uvařený žloutek skládá ze živočišných lipidů, výsledné zbarvení bylo zelené. Dále byla s provedena hydrolýza lecitinu, kde se po přidání Lugolova roztoku vytvořily hnědé a následně, po přidání reineckátu amonného, růžové krystalky cholinu. Výsledné krystalky byly pozorovány pod mikroskopem (zvětšení: 100x) a zaznamenány v protokolu.

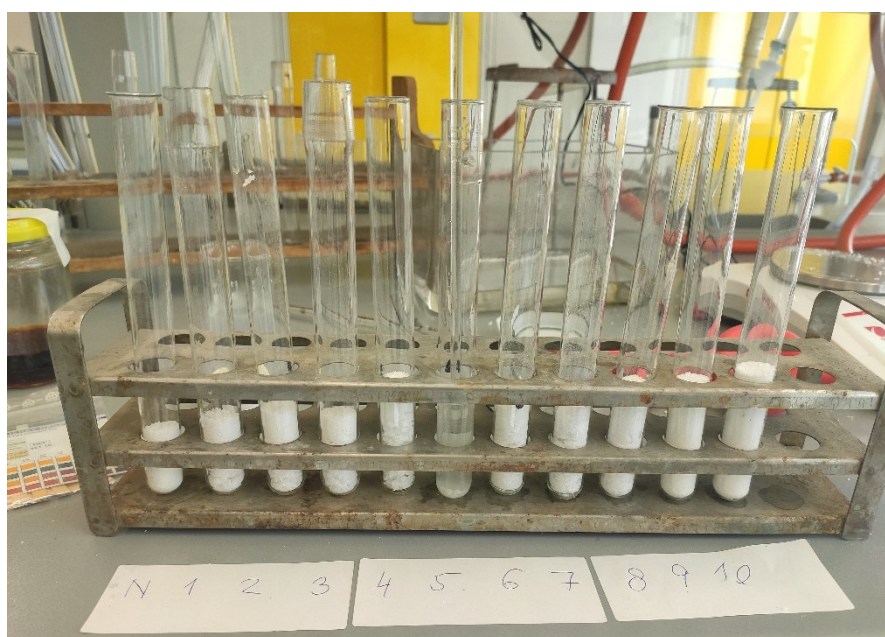
4.4 Úloha: Enzymové reakce na pH

Výsledky

1. Příprava enzymu, substrátu a pufrů

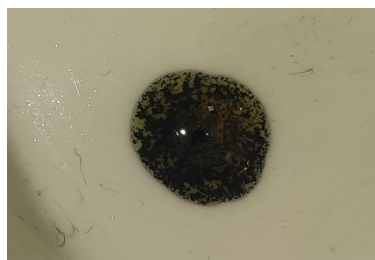


Obrázek 4.22 Vlevo: Na obrázku vlevo je roztok škrobu. Tmavá tekutá látka je předem vytvořený Lugolův roztok, pevná bílá látka je fosforečnan sodný. Také jsou na obrázku dva druhy identifikačních pH papírků. Vpravo: Povaření roztoku škrobu nad kahanem.



Obrázek 4.23 Příprava jednotlivých pufrů podle tabulky pomocí kyseliny citronové a fosforečnanu sodného.

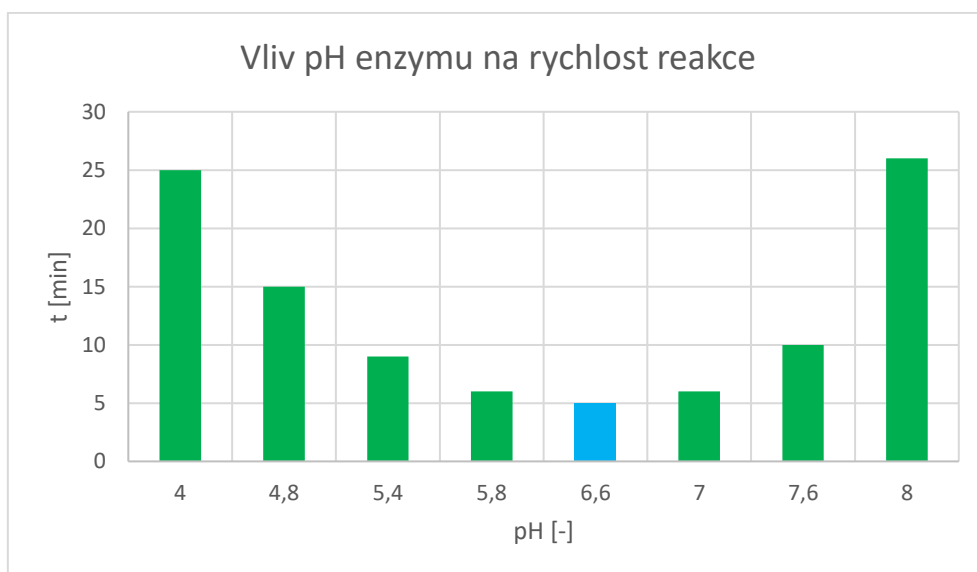
2. Optimální pH enzymové reakce α -amylázy



Obrázek 4.24 Výsledné zbarvení kapky Lugolova roztoku na porcelánové destičce po přidání dostatečného množství vzorků enzymu o různém pH ze zkumavek.

Tabulka 4.6 Výsledky reakce α -amylázy.

Zkumavka č.	pH [-]	t_{REAKCE} [min]
N	5,6 či 7,4	8
1	3	-
2	4	25
3	4,8	15
4	5,4	9
5	5,8	6
6	6,6	5
7	7	6
8	7,6	10
9	8	26
10	8,3	-



Graf 3: Vliv pH na rychlost reakce enzymu α -amylázy.

Z časových důvodů nebylo měření rychlosti reakce u vzorků s pH 3 a 8,3 dokončeno. Z grafu však vyplývá, že nejrychlejší byla reakce roztoku enzymu α -amylázy s pH 6. Reakce u slepého vzorku proběhla po osmi minutách. pH neznámého vzorku může být dle grafu zhruba 5,6 či 7,4.

Kontrolní otázky

1. Kde všude v lidském těle je enzym α -amylázy tvořen?

Tento enzym je tvořen, kromě slinných žláz, také v pankreatu neboli slinivce břišní. Právě slinivka břišní se podílí na dalším štěpení cukrů.

2. Jaké má tento enzym funkce?

α -amyláza zajišťuje štěpení škrobu na jednodušší sacharidy. Právě proto je jedním z nejdůležitějších enzymů lidského organismu. Tělo si samo nedokáže poradit se složitými sacharidy, právě proto je funkce α -amylázy nepostradatelná. Je to tedy trávicí enzym, který je přítomen u trávení.

3. Uveďte další příklady enzymů a jejich funkci.

Např. pepsin je enzym tvořený žaludeční tkání a zajišťuje rozklad bílkovin, je také přítomen u trávení. Trypsin je obdobný enzym jako pepsin, na rozdíl od pepsinu se nachází a tvoří ve dvanáctníku.

Závěr

Po náročnější přípravě specifikovaných pufrů byla realizace úlohy vcelku jednoduchá. Ke kapkám Lugolova roztoku byly po minutě přidávány kapky jednotlivých vzorků s pufrů. Po určité reakční době došlo k charakteristickému modrému zbarvení, tedy rozkladu škrobu a reakci s Lugolovým roztokem. Nejkratší čas reakce vzorku enzymu α -amylázy nastal při pH 6,6. Optimální pH reakce α -amylázy je tedy 6,6 pH. Zároveň byla naměřena doba reakce u neznámého vzorku a porovnána s naměřenými časy u ostatních vzorků. pH neznámého vzorku mohlo být dle grafu zhruba 5,6 či 7,4. Pomocí indikátorového pH papírku bylo potvrzeno pH o hodnotě 5,6.

Závěr

Aplikace biochemie v současné lékařské analýze a diagnostice pomocí laboratorních metod či již automatizovaných klinických přístrojů je velmi rozsáhlá. Tento trend bude bezpochyby pokračovat i v budoucnu, jelikož vývoj biochemických metod umožní vývoj celé diagnostické oblasti.

Přestože je v klinických laboratořích většina postupů již plně automatizovaná, tato práce byla vytvořena za účelem sestavení a realizování základních biochemických principů, které by byly realizovatelné i v nespecializovaném prostředí, např. v učebnách VŠB – TU Ostravy. Hlavním přínosem této práce je nenáročnost úloh. Úlohy jsou nenáročné na vybavení. Pomůcky a materiály nejsou finančně nákladné a práce s nimi je jednoduchá. Lze tedy tvrdit, že podle mých postupů a uvedených teoretických i praktických znalostí by měly být úlohy jednoduché i pro studenty, kteří se v oboru biochemie přímo nepohybují.

V první úloze k identifikaci aminokyselin jsem pomocí ninhydrinové metody ověřila přítomnost aminokyselin ve vytvořených roztocích aminokyselin, jako důkaz vznikla Ruhemanova violeť. Kromě provedení reakce jsem zjišťovala přesnou hmotnostní koncentraci aminokyselin ve zkumavkách. U alaninu, glycinu a albuminu byla koncentrace ve zkumavce asi 1 %, u tyrosinu pouze 0,05 %. Dále jsem dopočítala molární hmotnosti vzorků a jejich látkové množství. Nakonec jsem provedla metodu chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Metoda byla realizována u vzorků alaninu, glycinu a tyrosinu. U všech jsem metodou ověřila retenční faktory. Retenční faktor alaninu byl 0,27. Retenční faktor tyrosinu byl 0,45. Poslední glycin měl naměřený retenční faktor 0,23. Celkově se naměřené retenční faktory příliš nelišily od těch zadaných.

V druhé úloze ke stanovení proteinů jsem realizovala biuretovou reakci, kde fialové zbarvení opět prokázalo přítomnost proteinu ve vzorku vaječného bílku. Dále byla provedena Bradfordova metoda. Byly naměřeny absorbance u všech roztoků o různých koncentracích a zároveň i u neznámého vzorku. Absorbance neznámého vzorku při vlnové délce $\lambda = 595 \text{ nm}$, byla 0,657. Kalibrační faktor naměřených hodnot byl 26,002. Hodnota směrnice přímky byla 0,0385. Podle výpočtu byla koncentrace neznámého vzorku 17,083 $\mu\text{l/ml}$.

Ve třetí úloze k identifikaci lipidů jsem provedla extrakci lipidů a průkaz lecitinu. Liebermann-Burchardův test s filtrátem žloutku umožnil výsledné zelené zbarvení vzorku, které je charakteristické pro živočišné lipidy. Dále byla provedena hydrolýza lecitinu, kde se jako důkaz lecitinu, po přidání Lugolova roztoku, vytvořily hnědé a následně, po přidání reineckátu amonného, růžové krystalky cholinu.

Ve čtvrté úloze bylo analyzováno optimální pH reakce α -amylázy. Ke kapkám Lugolova roztoku byly po minutě přidávány kapky jednotlivých vzorků s připravenými pufry. Po určité reakční době došlo k charakteristickému modrému zbarvení, tedy rozkladu škrobu a reakci s Lugolovým roztokem. Nejkratší čas reakce vzorku enzymu α -amylázy nastal při pH 6,6. Optimální pH reakce α -amylázy je tedy 6,6 pH. Zároveň bylo zjištěno ideální pH neznámého vzorku, které bylo zhruba 5,6.

Dle mého zhodnocení proběhly úlohy bez problémů. Jelikož jsem dodržela základní ochranná opatření a měla na sobě všechny potřebné ochranné pomůcky, nedošlo k žádnému zranění. Osobně však doporučuji během práce větrat, jelikož kyselina octová produkuje mnoho nepříjemných výparů, které by neměly být příliš vdechovány. Úlohy jsem realizovala v laboratoři Gymnázia a SOŠPg

Jeronymova, přičemž úlohu se spektrofotometrem jsem dokončila v biochemických laboratořích Slezské nemocnice v Opavě. To mi také umožnilo prohlédnout si plně automatizovanou biochemickou laboratoř a přístroje, které se v této oblasti využívají.

K dalším postupům bych navrhovala, aby byl na fakultu pořízen UV/VIS spektrofotometr, jelikož je to přístroj používaný nejen k měření absorbance, ale i dalších důležitých parametrů. Je vhodný jak k analýze proteinů, tak i dalších biologických materiálů. Tento přístroj však patří k finančně nákladnějším, proto by mohl postačit POCT analyzátor STANDARD F100 (parametry), který se používá k měření mnoha parametrů. Je využíván jak v oblasti glukometrie, která je zásadní pro neinfekční civilizační onemocnění diabetes mellitus (cukrovku), ale i v oblasti měření hormonů a dalších látek, identifikovaných např. k analýze nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. Doporučila bych také použití automatizovaných pipet, jelikož většina odchylek v uvedených úlohách vznikla právě nepřesností při přípravě jednotlivých vzorků. Výsledky a postupy práce by se daly využít jako teoretický základ k dalším projektům a pracím týkajícím se analýzy biologických vzorků, resp. klinické biochemie.

Použitá literatura

- [1] VASUDEVAN, D. M., S. SREEKUMARI a Kannan VAIDYANATHAN. *Textbook of biochemistry: for medical students* [online]. 7th ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical, 2013 [cit. 2021-03-22]. ISBN 978-93-5090-530-2. Dostupné z: <https://med-mu.com/wp-content/uploads/2018/06/DM-Vasudevan-Textbook-of-Biochemistry-For-Medical-Students-6th-Edition.pdf>.
- [2] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie – chemický pohled na biologický svět* [online]. 2. vydání. Praha: VŠCHT Praze, 2018 [cit. 2021-03-22]. ISBN 978-80-7592-013-3. Dostupné z: <https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?isid=978-80-7592-013-3>.
- [3] HRVOLOVÁ, Barbora. *Biofyzika*. Ostrava: Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, 2013. ISBN 978-80-248-3105-3.
- [4] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, c1999. ISBN 80-726-2023-1.
- [5] TOMANDL, Josef. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-6973-2.
- [6] NELSON, Harry. *Atomy většiny prvků nejsou schopny samostatné existence*. United States, 2014. Dostupné také z: <https://www.slideserve.com/harry/atomy-v-t-iny-prvk-nejsou-schopny-samostatn-existence>. Prezentace vytvořena v programu Microsoft PowerPoint.
- [7] RŮŽIČKA, Denis. *Biochemie*. VŠCHT Praha, 2017. Prezentace vytvořena v programu Microsoft PowerPoint.
- [8] BENEŠOVÁ, Marika a Hana SATRAPOVÁ. *Odmaturuj! z chemie*. Brno: Didaktis, c2002. Odmaturuj! ISBN 80-862-8556-1.
- [9] PEČ, Pavel. Univerzita Palackého v Olomouci: Přírodovědecká fakulta. *Laboratorní cvičení z biochemie*. [online]. Olomouc: UPOL, 2008 [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BCHC_Pec_skripta2008.pdf.
- [10] ČERVINKA, Otakar, Miloslav FERLES a Václav DĚDEK. *Organická chemie: učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické* [online]. 4. vyd., 1. vyd. v Informatoriu. Praha: Informatorium, 1991 [cit. 2021-03-22]. ISBN 80-85427-03-6.
- [11] CANOV, Michael. *Biochemie. Dobrý den, zájemce o trochu chemie vítá Michael Canov* [online]. Liberec: Gymnázium a Střední odborná škola pedagogická, Liberec, Jeronýmova 425/27, příspěvková organizace, 2006 [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: <http://canov.jergym.cz/>.
- [12] DVOŘÁČKOVÁ, Svatava. *Praktikum lékařské chemie a biochemie*. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015. ISBN 978-80-244-4449-9.
- [13] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 3. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [14] DOLEŽAL, Marek. *Aminokyseliny, peptidy a bílkoviny* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2012 [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~dolezala/CHPP/4%20Aminokyseliny.pdf>.
- [15] ZBARSKIJ, Boris Il'jič, Aleksandr Ivanovič SOLNCEV a Il'ja Borisovič ZBARSKIJ. *Praktická cvičení z biochemie: učební pomůcka pro vys. školy zeměd., veterinární a zootechnické fakulty*. Praha: SZdN, 1956.
- [16] BLAHOVEC, Ján, Ludmila ŠLESÁROVÁ a Il'ja Borisovič ZBARSKIJ. *Enzymy a klinická enzymologie: učebnice pre vysoké školy*. Košice: Zenit-Press, 1991. ISBN 80-7143-004-8.

- [17] BANDODKAR, Amay J., Somayeh IMANI, Rogelio NUÑEZ-FLORES, Rajan KUMAR, Chiyi WANG, A.M. Vinu MOHAN, Joseph WANG a Patrick P. MERCIER. *Re-usable electrochemical glucose sensors integrated into a smartphone platform. Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, 101, 181-187 [cit. 2020-12-20]. DOI: 10.1016/j.bios.2017.10.019. ISSN 09565663.
- [18] ESPERÓN-ROJAS, Alaina A., Cristóbal TORRES-PALACIOS, Dalia SANTOS-LUNA, R. BAEZA-JIMÉNEZ, Cynthia CANO-SARMIENTO a Hugo S. GARCÍA. *A Specific Thin Layer Chromatography Method for the Identification and Separation of Medium Chain Acylglycerols. Journal of Oleo Science* [online]. 2018, 67(11), 1397-1403 [cit. 2020-12-20]. ISSN 1345-8957. DOI: 10.5650/jos.ess18081.
- [19] EDWARDS, P., ZHANG, C., ZHANG, B. *Smartphone based optical spectrometer for diffusive reflectance spectroscopic measurement of hemoglobin* [online]. *Sci Rep* 7, 12224 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-12482-5.
- [20] NAZARI, Milad, Måns EKELÖF, Sitora KHODJANIYAZOVA, Nathaniel L. ELSÉN, Jon D. WILLIAMS a David C. MUDDIMAN. *Direct screening of enzyme activity using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization. Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2017, 31(22), 1868-1874 [cit. 2020-12-20]. ISSN 09514198. DOI:10.1002/rcm.7971.
- [21] BRYJOVÁ, Iveta. VŠB – TU Ostrava, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství. *Biochemie: Speciální zdravotnická technika a diagnostika*. Ostrava, 2020. Prezentace vytvořena v programu Microsoft PowerPoint.
- [22] *Identifikace a vlastnosti aminokyselin: Aminokyseliny* [online]. Olomouc, 2020 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BCHC_Aminokyseliny.pdf. Výukový materiál. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- [23] 18. KVALITATIVNÍ ANALÝZA – TENKOVRSTVÁ CHROMATOGRRAFIE (TLC) [online]. Brno, 2018 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2018/C7640/um/18_IA_tenkovrstva__chromatografie__TLC__navod.pdf. Výukový materiál. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.
- [24] VEJRAŽKA, Martin. *Bílkoviny: Praktické cvičení z lékařské biochemie* [online]. Praha, 2020 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/2877/bilkoviny-202021-navod.pdf?version=202011121332>. Výukový materiál. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy.
- [25] *Základy fotometrie, využití v klinické biochemii* [online]. Brno, 2016 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLKBC0211p/um/Zaklady_fotometrie__krev__moc.pdf. Výukový materiál. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.
- [26] *Thin Layer Chromatography of aminoacids and short peptides. REACH Devices made in USA* [online]. United States: REACH Devices, 2017 [cit. 2021-03-26]. Dostupné z: http://www.reachdevices.com/TLC_aminoacids.html.
- [27] *Stanovení proteinu* [online]. Olomouc, 2020 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BCHC_Stanoveni_proteinu.pdf. Výukový materiál. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- [28] *Enzymy* [online]. Olomouc, 2020 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BCHC_Enzymy.pdf. Výukový materiál. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

- [29] *Laboratorní cvičení z lékařské chemie a biochemie II: 2. ročník, všeobecné lékařství*. Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, 2020. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/biochemie/pages/vyuka/materialy/2020_LCHBII_Navody_ZS.pdf.
- [30] Spektrofotometrie (2. LF UK) OLD. In: *WikiSkripta* [online]. Praha: 2. LF UK, 2020 [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_\(2._LF_UK\)_OLD](https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_(2._LF_UK)_OLD).
- [31] BÁRTOVÁ, Eva. Popis světelného mikroskopu. In: *Biologie a genetika pro bakaláře* [online]. Brno: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, 2014 [cit. 2021-04-09]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage=.

Dodatek A. Základy chemie

Tato kapitola se věnuje přiblížení základních poznatků, znalostí a pojmů potřebných k porozumění biochemickým procesům. V celé této kapitole bylo čerpáno ze zdrojů [1], [2] a [3].

A.1 Základní pojmy

Atom je nejmenší existující elektroneutrální⁸ částice, která uchovává chemické vlastnosti jednotlivých prvků. Skládá se ze záporně nabitého elektronového obalu, tvořeného několika vrstvami se záporně nabitými elektrony, a kladně nabitého jádra, to se skládá z kladně nabitých protonů a neutrálně nabitých neutronů. Jeho schopnost se vázat do složitějších molekul je dána počtem a uspořádáním tzv. valenčních elektronů, ty se nachází ve vnější vrstvě a umožňují tvorbu vazeb.

Molekula je nejmenší elektroneutrální část látky. Zachovává si chemické vlastnosti této látky. Je charakterizována složením, počtem přítomných atomů a jejich druhem, strukturou, vzájemným uspořádáním atomů a typem vazeb. Dvou či víceatomové molekuly dělíme na:

Homonukleární molekuly obsahující atomy stejného prvku, např. O_2 , H_2 , N_2 .

Heteronukleární molekuly obsahující atomy odlišných prvků, např. H_2O , HCl .

U některých látek nelze identifikovat molekuly, určuje se tedy nejmenší část látky, která složením odpovídá dané látce a nazývá se *vzorcovou jednotkou*. Od vzorcové jednotky je poté odvozen název látky, např. dvojice iontů F^{-1} a Na^{+1} ve fluoridu sodném.

Látka představuje konkrétní druh hmoty, která má stálé fyzikální vlastnosti za určitých podmínek. Všechny látky se skládají z atomů. Podle složení rozlišujeme chemicky čisté látky, které dělíme na prvky a sloučeniny, a směsi. Směsi dále dělíme na homogenní, koloidní a heterogenní.

Prvek je chemicky čistá látka se stálými charakteristickými vlastnostmi, např. teplotou varu či tání, hustotou. Prvek je složen z atomů se stejným protonovým číslem, to nám udává počet protonů v jádře. Skládá-li se z atomů se stejným nukleonovým číslem⁹, je nazýván *nuklidem*. Prvky mohou být nesloučené, mohou tvořit molekuly nebo složitější struktury pomocí vazeb.

Sloučenina je opět chemicky čistá látka složená z atomů jednoho či více prvků. Atomy mohou tvořit složitější struktury, např. krystalické, nebo mohou být uspořádány v izolovaných molekulách.

Směs se skládá z několika chemicky čistých látek, proto vlastnosti směsi neboli disperzní soustavy jsou závislé na složení směsi a nebývají stálé. Jak již bylo uvedeno výše, existují:

Homogenní směsi, které jsou tvořené jedinou fází¹⁰, např. roztoky či vzduch.

Koloidní směsi, které jsou tvořeny rozptýlenými částicemi ve velkém množství jiné látky, např. vaječný bílek ve vodě.

Heterogenní směsi obsahující více vzájemně oddělených fází, např. voda a písek.

Atomový orbital je funkce popisující prostorové rozložení elektronu v poli jednoho atomového jádra. Lze si to představit jako prostor, který je obsazen elektronem nebo párem elektronů s opačným spinem. Spin nabývá hodnot $+1/2$ nebo $-1/2$ a určuje spinový stav elektronu v daném orbitalu.

⁸ Částice má stejný počet protonů v jádře a elektronů v obalu. Celkový náboj je tedy neutrální [5].

⁹ Hmotnostní neboli nukleonové číslo udává počet protonů a neutronů v jádře [5].

¹⁰ Pojem, který popisuje stejné fyzikální a chemické vlastnosti v objemu látky [5].

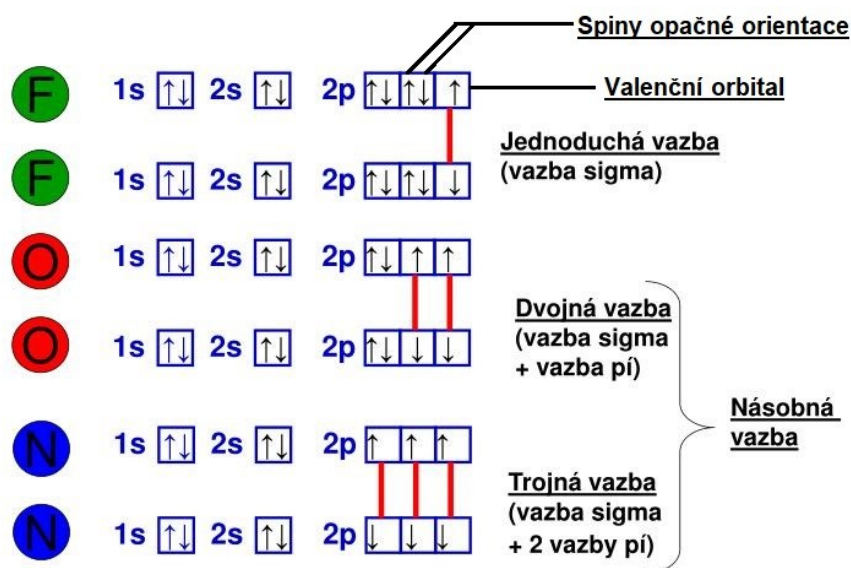
A.2 Chemické vazby

Kromě vzácných plynů se všechny látky skládají z atomů, které jsou spojené různými chemickými vazbami a tvoří tak molekuly. Při vzniku chemické vazby dochází k přerozdělení neboli redistribuci elektronů příslušných atomů tak, aby vzniklo nové energeticky výhodnější uspořádání. Při vzniku vazby se uvolňuje tzv. *vazební energie*, která se rovná energii potřebné ke zpětnému rozštěpení, a udává pevnost vazby. Energie se udává v jednotkách kJ/mol. Základními typy vazeb jsou vazby iontové a kovalentní.

Kovalentní vazba je charakteristická pro nekovové prvky. Principem této vazby je sdílení jednoho či více elektronových párů mezi dvěma atomy. Uvolněná vazební energie nabývá hodnot mezi 200–1000 kJ/mol. Kovalentní vazbu lze dělit podle druhu vazby na jednoduchou a násobnou.

Jednoduchá vazba vzniká sdílením jednoho elektronového páru při spojení dvou atomů. Vazba je tvořena vazbou σ (sigma), jelikož dochází k překrytí valenčních orbitalů na spojnici atomových jader, viz Obrázek A.1.

Násobná vazba vzniká při sdílení více elektronových párů mezi dvěma atomy. Skládá se z vazby σ , ale také z vazby π (pí), jejichž hustota je největší právě mimo spojnici atomových jader. Tyto násobné vazby jsou typické např. pro uhlíkaté sloučeniny, jelikož jsou pevnější než vazby jednoduché. Velikost vazební energie je tedy větší u násobných vazeb, ale neodpovídá násobkům vazeb jednoduchých.



Obrázek A.1 Schématické zobrazení jednoduchých a násobných kovalentních vazeb pomocí elektronové konfigurace. Na obrázku je vidět rozdělení s, p orbitalů, dále existují také d a f orbitaly. Pauliho princip uvádí, že každý orbital může obsahovat pouze 2 elektrony s opačnými spiny. Na základě propojení volných elektronů s opačným spinem vznikají jednotlivé vazby. Podle [5].

Dále lze kovalentní vazby dělit na základě rozdílu elektronegativit¹¹ jednotlivých atomů. Pokud je kovalentní vazba tvořena atomy s přibližně podobnou elektronegativitou, jedná se o vazbu *nepolární*. V nepolární vazbě jsou sdílené vazebné elektrony rovnoměrně rozloženy mezi oběma atomy. Obecně je to vazba, jejíž rozdíl elektronegativit je menší než 0,4. Naopak vazba *polární* vzniká u propojení atomů s různou elektronegativitou. Elektronový pár je k jednotlivým atomům poután

¹¹ Elektronegativita je schopnost atomů přitahovat valenční elektrony [5].

různou silou, a proto není rozložen rovnoměrně. Pár bude posunutý blíže k atomu s větší elektronegativitou a tím vzniknou parciální náboje atomů. Atom s vyšší elektronegativitou získá záporný parciální náboj (δ^-) a atom s menší elektronegativitou získá kladný parciální náboj (δ^+). U polárních vazeb se rozdíl elektronegativit pohybuje v rozmezí 0,4–1,7.

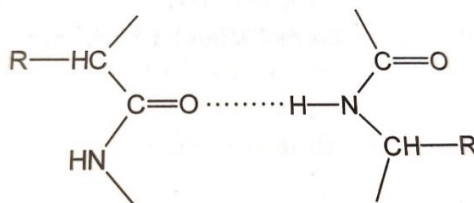
Se zvláštním typem kovalentních vazeb se můžeme setkat u komplexních sloučenin. Jedná se o tzv. *koordinačně kovalentní* vazbu jinak také donor-akceptorovou či dativní. Vazba se vyznačuje tím, že elektrony vazebného páru poskytuje pouze jeden z vázaných atomů. Atom s volným párem elektronů se nazývá *donor*, naopak atom s volným valenčním orbitalem se nazývá *akceptor*. Akceptorem elektronového páru bývá obvykle kladný ion či atom přechodného kovu. Donorem jsou naopak molekuly či záporné ionty, nazýváme je *ligandy*. Počet ligandů vázajících se na centrální atom udává koordinační číslo, obvykle má hodnoty 6 nebo 4.

Počet kovalentních vazeb, které z prvku v dané sloučenině vycházejí, nám udává vaznost prvku. Ta je limitována počtem atomových orbitalů ve valenční vrstvě. Atom vodíku může tvořit pouze jednu kovalentní vazbu, jelikož má pouze jeden valenční atomový orbital. Naopak atomy uhlíku nebo dusíku, obsahují 4 valenční orbitály, proto jsou čtyřvazné.

Iontová vazba je přímo extrémním případem polární kovalentní vazby. Sdílené elektrony jsou vlivem velkých rozdílů elektronegativit atomů vtaženy do oblasti elektronegativnějšího atomu. Vznikají tak dva opačně nabitě ionty. Ionty se vzájemně přitahují elektrostatickými silami. Iontový charakter vazby převládá, pokud je rozdíl elektronegativit větší než 1,7.

Mezi další interakce atomů můžeme zařadit např. vodíkové můstky a slabé nevazebné interakce. Energie slabých nevazebných interakcí je značně menší než u kovalentních vazeb, lze je označovat jako nekovalentní vazby. Rozumíme tím přitažlivé síly mezi molekulami, které podmiňují soudržnost látek. Za nejsilnější nevazebnou interakci považujeme vodíkové vazby. Najdeme je ve sloučeninách obsahujících atom vodíku navázaný na silně elektronegativní atom, např. fluor, kyslík nebo dusík. Vazba je zde natolik polární, že vodík může vytvořit slabé vazby s volným elektronovým párem další molekuly. Energie této vazby je vyšší než u většiny nekovalentních vazeb.

Vodíkové vazby mohou být *intermolekulární* nebo *intramolekulární*. Veliké množství těchto vodíkových můstků lze najít v peptidových řetězcích. Značeny jsou tečkovanou čarou. Jejich tvorba je důležitá pro vznik sekundárních struktur.



Obrázek A.2 Příklad značení vodíkové vazby v peptidovém řetězci [5].

Jako **Van der Walsovy síly** jsou označovány slabé mezimolekulární interakce, které zahrnují síly *disperzní* a *elektrostatické*. Podstatou **elektrostatických interakcí** jsou *Coulombovy síly*, jež popisují přitažlivost mezi záporným a kladným elektrickým nábojem. Vzájemné elektrostatické interakce lze dělit na základě částic vstupujících do interakcí. Dělí se na interakce *ion-ion*, *ion-dipól* nebo *dipól-dipól*. Interakce *ion-ion* se uplatňuje v mřížkách iontových sloučenin, díky ní vznikají solné můstky v roztocích.

Také se podílí na kvartérní struktuře proteinů, jelikož propojuje vedlejší řetězce aminokyselin. Na rozdíl od předchozího typu jsou interakce *ion-dipól* a *dipól-dipól* mnohem slabší a jejich velikost převážně závisí na velikosti jednotlivých nábojů. Čím větší náboj, tím je vazba silnější. U polárních látek¹² jsou elektrostatické interakce zodpovědné, méně těkavé. Právě proto se uplatňují u látek polárních.

Naopak **disperzní síly** najdeme u nepochárních látek¹³. U těchto látek nemajících stálý dipól, často vedou k okamžité nerovnoměrnosti rozložení náboje a zapříčiňují vznik dočasných dipólů. Následkem je vzájemné přitahování molekul.

A.3 Energetika chemických reakcí

Energetická stránka reakcí bývá sledována ze dvou různých hledisek. Prvním hlediskem je změna celkové energie systému. Druhým hlediskem jsou podmínky, při kterých je daný děj realizovatelný a při kterých nikoliv.

Za oddělenou oblast, ve které se odehrávají chemické reakce, považujeme *chemický systém*. Ten může být jednoduchý, např. nádoba s reagujícími složkami, nebo složitý, např. buňka či organismus. Existují tři různé typy systémů podle výměny hmotnosti a energie s okolím. V *izolovaném systému* nedochází k výměně hmoty ani energie. U *uzavřeného systému* dochází k pouze k výměně energie. V *otevřeném systému* lze měnit hmotu i energii, s tímto systémem se setkáváme u většiny biologických systémů. Stavby systémů definují tzv. *stavové veličiny*. Mezi základní stavové veličiny patří objem V , tlak p a teplota T . Většina biologických procesů probíhá za konstantního atmosférického tlaku, průměrně 101,325 kPa, a za konstantní teploty. Při procesech bez použití plynných látek probíhají reakce za konstantního objemu.

Každý uzavřený systém má za daných podmínek svou vnitřní energii U . Vnitřní energie zahrnuje všechny formy energie v systému, u jednotlivých systémů není obecně známa, jelikož závisí na velikosti daného systému. Při změnách stavu systému lze vypočítat její změnu,

$$\Delta U = U_2 - U_1, \quad (\text{A.3.1})$$

kde ΔU je změna energie v systému, U_2 je energie konečného stavu systému a U_1 je energie počátečního stavu systému. Změna vnitřní energie v sobě zahrnuje teplo Q , uvolněné či přijaté systémem v průběhu reakce, ale také energii vydanou nebo přijatou ve formě práce ΔW ,

$$\Delta U = Q + \Delta W. \quad (\text{A.3.2})$$

Rovnice představuje matematické vyjádření 1. termodynamického zákona, zákona o zachování energie. Práce W se v chemických reakcích nejčastěji objevuje ve formě mechanické energie. Jedná se o vykonanou či přijatou práci na úkor změny objemu daného systému, výraznější změny nastávají v plynných systémech. Energie zase zvyšuje neuspořádaný pohyb molekul a atomů, tím dochází ke změně teploty Q v systému i jeho okolí.

¹² Molekuly polární rovnoměrně nesdílejí elektrony v kovalentní vazbě, proto vzniká dipól nesoucí mírný kladný ale i záporný náboj. Princip velkého rozdílu elektronegativit [5].

¹³ Nepochární molekuly sdílejí elektrony rovnoměrně, není čistý náboj v celé molekule. Princip malého rozdílu elektronegativit [5].

Všechny chemické reakce si lze představit jako sled dějů, při nichž dochází k zániku vazeb mezi atomy výchozích látek a vzniku nových vazeb mezi atomy tvořícími výsledný produkt. Ke štěpení původních vazeb je třeba dodat určité množství energie, při vzniku nových vazeb lze naopak energii získat. Při dějích probíhajících za konstantního tlaku se používá stavová veličina tzv. **entalpie H**. Změna entalpie ΔH je rovna reakčnímu teplu Q_p , které systém přijal nebo odevzdal. Hodnota ΔH udává rozdíl energií vazeb u produktů a reaktantů¹⁴,

$$\Delta H = H_2 - H_1 = Q_p, \quad (\text{A.3.3})$$

kde ΔH je tedy změna entalpie, H_1 zde představuje vnitřní energii vazeb reaktantů, H_2 je vnitřní energie vazeb produktů a Q_p je reakční teplo. Podle hodnoty reakčního tepla rozlišujeme reakce na *exotermní*, při nichž se teplo spotřebovává ($\Delta H > 0$), a na *endotermní*, při těch se naopak teplo uvolňuje ($\Delta H < 0$). U některých reakcí se lze setkat s jiným značením reakčního tepla. Setkáváme se např. s teplem slučovacím, spalným, rozkladným, skupenským či rozpouštěcím.

U neuspořádaných systémů nám jejich stav popisuje stavová funkce **entropie S**, čím je entropie vyšší, tím je systém neuspořádanější. Změna entropie ΔS je definována jako podíl přijatého tepla Q a teploty T , při které děj probíhá. U dějů vratných, probíhajících oběma směry, platí:

$$\Delta S = \frac{Q}{T}, \quad (\text{A.3.4})$$

pro nevratné děje, probíhající pouze v jednom směru, platí:

$$\Delta S > \frac{Q}{T}. \quad (\text{A.3.5})$$

Pro děje v uzavřených systémech za konstantní teploty a daného tlaku je definována stavová veličina tzv. **Gibbsova energie G**. Ta zahrnuje vliv obou kritérií, jak entropie, tak i entalpie, na uskutečnitelnost reakce. Někdy je označována jako *volná entalpie*. Pro Gibbsonovu energii platí:

$$G = H - T \times S. \quad (\text{A.3.6})$$

Změna Gibbsonovy energie ΔG chemické reakce je dána rovnicí,

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \Delta H - T \times \Delta S, \quad (\text{A.3.7})$$

kde G_2 je Gibbsova energie systému v konečném stavu a G_1 je Gibbsova energie systému v počátečním stavu. Vztah je v podstatě vyjádřením 2. zákona termodynamiky. Hodnota ΔG vyjadřuje maximální energii, kterou lze využít systémem k vykonání neobjemové práce. Výraz $T \times \Delta S$ vyjadřuje minimální energii, kterou lze využít pouze jako teplo Q . ΔG je hlavním kritériem pro spontánnost reakcí. Samovolně mohou probíhat takové reakce, u kterých klesá volná entalpie. Takové děje nazýváme *exergonními* ($\Delta G < 0$). Samovolně probíhají, dokud není dosaženo rovnovážného stavu, tj. $\Delta G = 0$. Naopak děje *endergonní* ($\Delta G > 0$) nemohou proběhnout spontánně. Záporná hodnota ΔG je základní podmínkou pro samovolný průběh reakce. Spontánnost však ovlivňují další podmínky. Musí být dosaženo potřebné aktivační energie reaktantů, nebo musí být přidána katalyzační látka, která umožní spuštění reakce. Hodnota ΔG nemá přímý vztah s rychlostí reakcí.

¹⁴ Za reaktanty jsou považovány látky vstupující do reakce, kde vlivem procesů tvoří produkty [5].

Dodatek B. Sacharidy

Sacharidy jsou nejrozsáhlejší skupinou přírodních látek, z nichž má většina sladkou chuť a je rozpustná ve vodě. Vznikají při fotosyntéze v zelených rostlinách z H_2O (vody) a CO_2 (oxidu uhličitého), kdy samotné reakci dodává energii sluneční záření. Jsou velice důležité pro všechny živé organismy, jelikož pro ně mají zásobní a stavební funkci, ale jsou také zdrojem energie pro živočichy a jiné mikroorganismy. Skupina sacharidů je tvořena atomy uhlíku, vodíku a kyslíku v různých strukturách. Některé sacharidy jsou součástí dalších nukleotidů a nukleových kyselin [3].

B.1 Struktura a dělení sacharidů

Dříve se sacharidům říkalo uhlohydráty, jelikož existovala zkreslená představa, že sacharid je v podstatě hydratovaná forma uhlíku. Domněnka vycházela ze sumárního vzorce $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_m$, kde platí, že $m \leq n$. Podle tohoto vzorce sacharidy obsahují prvky vody a uhlíku v poměru 1:1. Sacharidy neboli glycidy jsou definovány jako **polyhydroxyaldehydy** a **polyhydroxyketony**, dělí se do tří skupin. První skupinou jsou *monosacharidy* či jednoduché sacharidy. Nelze je hydrolýzou¹⁵ štěpit na jednodušší sloučeniny, patří sem také deoxycukry. Další skupinou jsou *oligosacharidy*, které obsahují 2–10 monosacharidových jednotek spojených tzv. glykosidovými vazbami. Mezi nejběžnější oligosacharidy patří právě disacharidy. Poslední skupinou jsou *polysacharidy*, ty mohou obsahovat až tisíce monosacharidů [3].

Monosacharidy – jednoduché sacharidy

Monosacharidy jsou chemicky monooxopolyhydroxosloučeniny. Rozdělujeme je na *aldózy* a *ketózy* podle typu karbonylové funkční skupiny¹⁶. Aldózy neboli polyhydroxyaldehydy obsahují aldehydovou skupinu: $-\text{CHO}$ a několik hydroxylových skupin: $-\text{OH}$. Ketózy neboli polyhydroxyketony obsahují ketoskupinu: $-\text{CO}$. Názvy monosacharidů vychází z řeckých číslovek odpovídajících počtu uhlíkových atomů v molekule. U aldóz končí jednotlivé názvy monosacharidů písmeny: *-óza* (např. tetróza, hexóza, pentóza, trióza). Obecné názvy ketóz mají zakončení: *-ulóza* (např. tetrulóza, hexulóza, pentulóza). Nejjednoduššími monosacharidy jsou glyceraldehyd a dihydroxyaceton, viz Obrázek B.1 na následující straně. Kromě dihydroxyacetonu mají všechny sacharidy minimálně jedno **chirální centrum**. Chirální centrum je název asymetrického atomu čtyřvazného uhlíku, který má na každé vazbě jiný substituent¹⁷ [5].

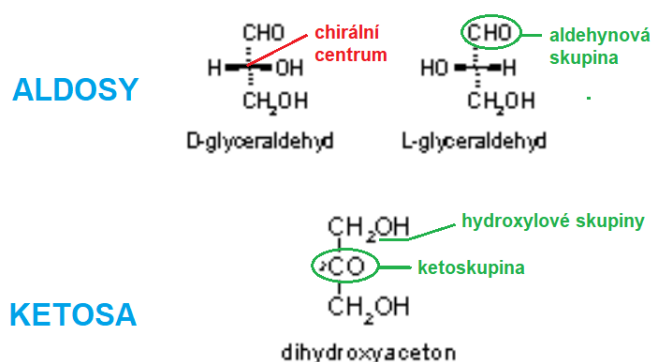
Důležitá je také konfigurace monosacharidů. Jelikož se u sacharidů setkáváme se stereoizomerií, kdy jsou všechny atomy molekul vázány stejným způsobem, ale jsou jinak zobrazené v prostoru. Dělíme je proto na **D-formy** (podle *dexter* v překladu pravý) a **L-formy** (podle *laevo* v překladu levý). Při rozdělování do skupin se řídíme konfigurací na posledním chirálním centru, pokud je zde hydroxylová skupina vpravo jako u D-glyceraldehydu, jedná se o sacharid D-formy. Stereoizomery lze dále rozdělit na *enantiomery*, jež mají odlišnou konfiguraci na všech chirálních

¹⁵ Hydrolýza je druh rozkladné reakce, kde je voda reakčním činidlem. Využívá se k přerušení chemických vazeb v jiné reakční složce [10].

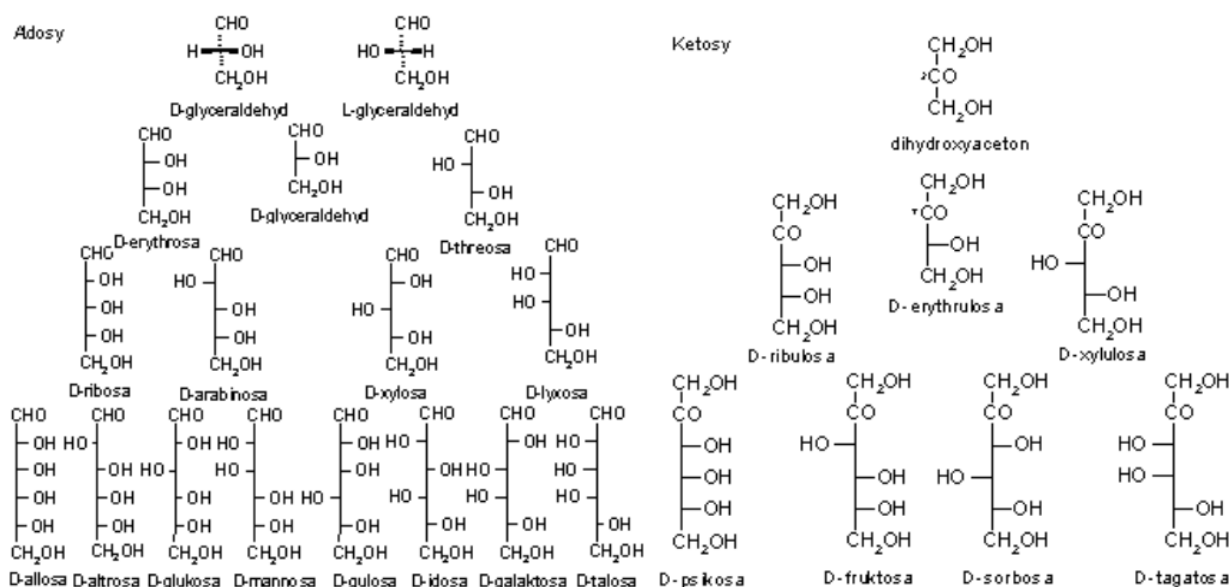
¹⁶ Karbonylová skupina se skládá z atomu uhlíku vázaného dvojnou vazbou na atom kyslíku [10].

¹⁷ Atom či skupina atomů nahrazující atom vodíku v původním řetězci uhlovodíku [11].

uhlíkách, a *diastereomery*, jež mají nejméně na jednom chirálním uhlíku shodnou konfiguraci a na jednom neshodnou [11].



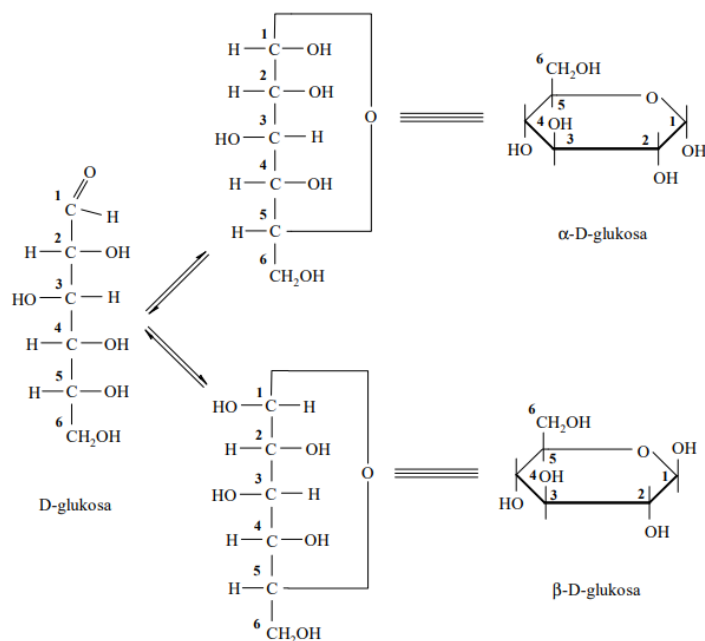
Obrázek B.1 Zobrazení řetězců nejjednodušších monosacharidů neboli trióz (obsahují 3 atomy uhlíků). *Nahoře:* Zobrazení enantiomerů glyceraldehydu, který má pouze jedno chirální centrum. Formy glyceraldehydu se liší konfigurací právě v tomto centru, proto máme 2 různé formy tohoto monosacharidu. *Dole:* Zobrazení nejjednodušší ketózy. Dihydroxyaceton nemá chirální centrum, jelikož má ketoskupinu tvořenou dvojnou vazbou mezi uhlíkem a kyslíkem. Podle [5] a [4].



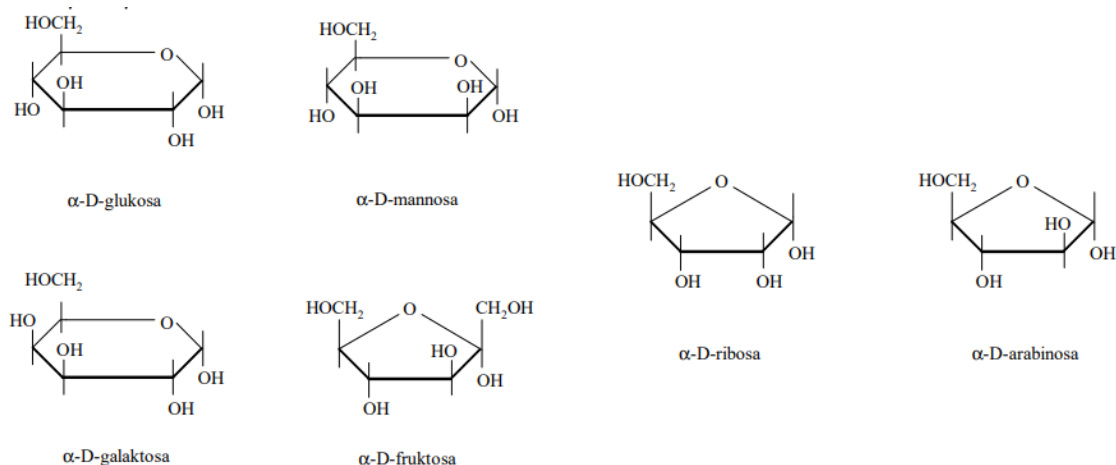
Obrázek B.2 Zobrazení řetězců aldóz a ketóz pomocí Fischerovy projekce, převzato z [11]. K biochemicky významným sacharidům z řad aldóz patří např. D-glyceraldehyd, D-ribóza (součást RNA) a glukóza, jelikož je primárním zdrojem energie činnosti mozku. K významným ketózám patří fruktóza (hroznový cukr) [3].

Sumární vzorec pro monosacharidy je $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$. Existují však 3 různé způsoby projekce. Základním způsobem je **Fischerova projekce**, Obrázek B.2, která zobrazuje monosacharidy v lineárních formách, viz Obrázek B.1 výše. Chirální centrum je zde označováno průsečíkem úseček a vodíkové atomy nejsou v nákresech zobrazovány. Ve skutečnosti se s lineární formou monosacharidů setkáme jen zřídka. Dochází u nich k vnitřní cyklizaci, nejčastěji hydroxylová skupina na čtvrtém či pátém uhlíku reaguje s karbonylovou skupinou a vzniká tzv. poloacetalová skupina. Pětičlenný kruh se poté nazývá furanóza a šestičlenný kruh je pyranóza, viz Obrázek B.3 na další straně. Cyklické formy se převážně používají u pentóz, hexóz a vyšších monosacharidů. Způsoby projekce zobrazující cyklickou formu

sacharidů jsou **Tollensova projekce** a **Haworthova projekce**, kdy je monosacharid prostorově zobrazen v cyklu, viz Obrázek B.3 [11].



Obrázek B.3 Cyklizace monosacharidů a jejich zobrazení pomocí tří různých projekcí. *Vlevo:* Fischerova projekce monosacharidu D-glukózy a vyznačení následné cyklizace hydroxylové skupiny pátého uhlíku s karbonylovou skupinou. *Uprostřed:* V Tollensově projekci je již zobrazená cyklická vazba, monosacharid je v cyklické formě. Místo karbonylové skupiny byl vytvořen nový chirální uhlík nazývaný *anomerní*, uhlík označený číslem 1. *Vpravo:* Haworthova projekce, kdy je anomerní uhlík umístěn vpravo a heteratom kyslíku je v cyklu nahoře. Vazby zobrazené ve Fischerově projekci vlevo směřují nahoru, vazby vpravo dolů. Směřuje-li skupina: -CH₂OH nad rovinu cyklu, jedná se o **β-formu**, pokud směřuje pod rovinu cyklu, jedná se o **α-formu**. Tyto dva izomery jsou nazývány jako *α anomery* a *β anomery* [9].



Obrázek B.4 Haworthovy vzorce vybraných monosacharidů [9].

Při zápisu kompletních názvů sacharidů musíme uvést skutečnosti v tomto pořadí:

- anomerie (α/β)
- řada (D/L)

- název monosacharidu (např. glukóza)
- typ poloacetalové formy (furanóza/pyranóza)

Ukázkou kompletního názvu monosacharidu je např. α -D-glukopyranosa. Typ poloacetalové formy se mnohdy neuvádí, viz Obrázek B.4 na předchozí straně. Někdy jsou názvy jednotlivých sacharidů příliš dlouhé, proto je možné se setkat se zkráceným zápisem, např. α -D-glc-p. Zkratka názvu se uplatní hlavně při nazývání oligosacharidů a polysacharidů [11].

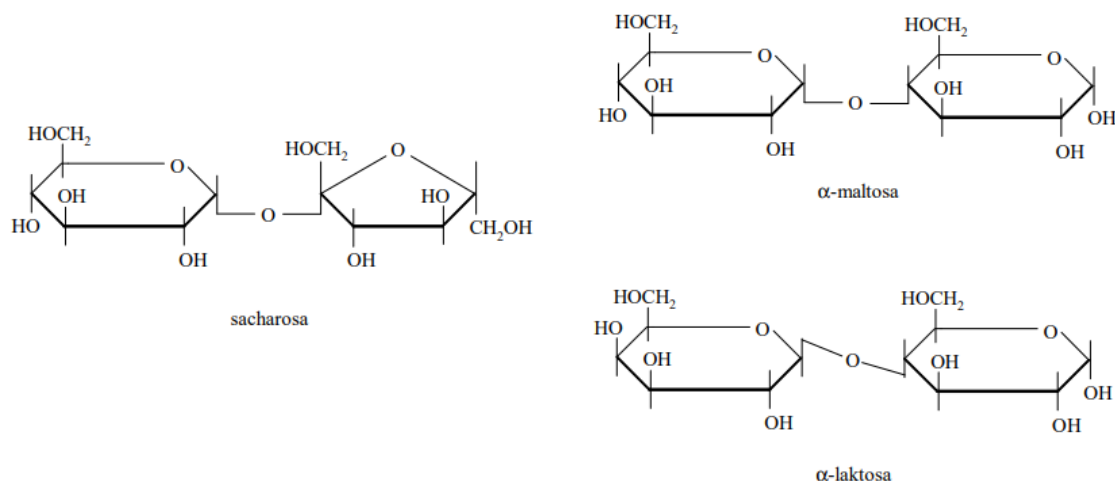
Monosacharidy lze dělit podle dalších chemických vlastností. Monosacharidy, které jsou přítomny v organismech jako metabolické produkty jsou **primární monosacharidy**, patří sem např. glyceraldehyd, dihydroxyaceton, D-ribóza, D-ribulóza, D-fruktóza a D-glukóza. Další skupinou jsou **sekundární monosacharidy**, které nejsou součástí buněčných metabolismů a jejich přítomnost v organismech není nezbytně nutná. Patří sem např. D-manóza, D-galaktóza, L-arabinóza a D-xylóza. Další skupiny a jejich názvy jsou odvozené od biochemických procesů a změn v jejich vazbách a struktuře. Uvedené jsou zde pouze některé z nich. Významné jsou **deoxymonosacharidy**, což jsou produkty složitější redukce¹⁸. Největší význam má 2-deoxy-D-ribóza, kde číslo 2 označuje nahrazení hydroxylové skupiny atomem vodíku na druhém uhlíku. **Aminosacharidy** jsou monosacharidy, u nichž je některá z hydroxylových skupin nahrazena aminoskupinou $-\text{NH}_2$. Dále existují také acetylované monosacharidy, O-methylované sacharidy nebo např. cukry s větveným řetězcem [11].

Oligosacharidy – složené sacharidy

Oligosacharidy jsou tvořeny dvěma až deseti jednotkami monosacharidů. Jsou klasifikovány jako di-, tri-, tetrasacharidy atd. podle počtu monosacharidových jednotek. Spojení je realizované buď α -glykosidovou či β -glykosidovou vazbou. Na anomerní hydroxyl jedné molekuly se váže alkoholový hydroxyl nebo anomerní hydroxyl druhé molekuly. V prvním případě se jedná o **redukující disacharidy**, někdy také označované jako maltosová skupina oligosacharidů, které mohou tvořit glykosidy s dalšími sloučeninami. Monosacharidové podjednotky jsou spojeny vazbami 1,6 a 1,4 (čísla uhlíků tvořících vazbu molekul). Vazba tvořená anomerními hydroxylly vzniká u skupiny **neredukujících disacharidů**, někdy označovaných jako trehalosová skupina oligosacharidů, které neredukují Benediktovo činidlo. Spojení je realizováno vazbou 1,1. Vazby jsou zobrazeny na Obrázek B.5 na následující straně [3].

¹⁸ Redukce, tj. hydrogenace karbonylové skupiny aldóz a ketóz neboli nahrazení skupiny atomem vodíku. Pomocí redukce vznikají cukerné alkoholy [5].

V triviálních názvech redukujících sacharidů se používá označení anomerie (α/β). Obecný název redukujícího sacharidu je *glykosyl-glykóza*, kde je před názvem uvedeno číslo uhlíku poskytujícího alkoholový hydroxyl vazbě. U neredukujícího sacharidu je obecný název *glykosyl-glykosid*, u něhož jsou monosacharidové složky řazeny abecedně, viz Obrázek B.5 [5].

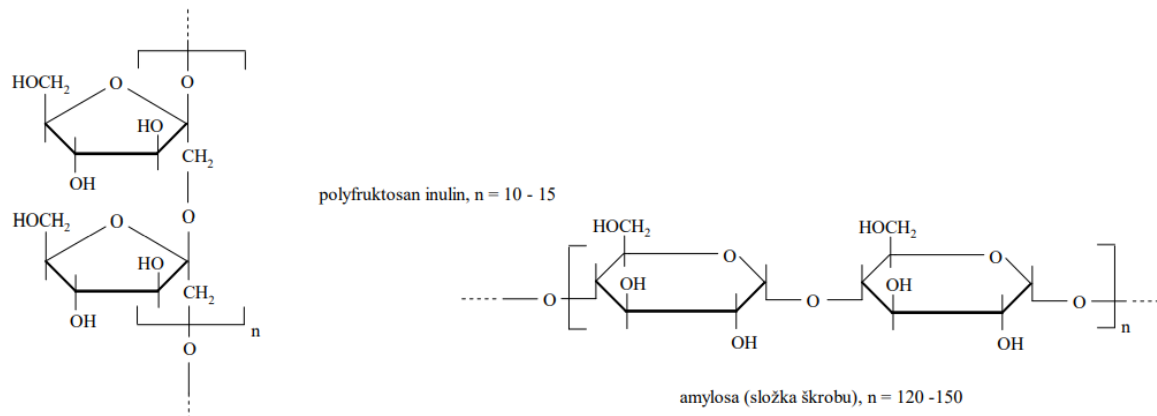


Obrázek B.5 Haworthovy vzorce vybraných disacharidů se sumárním vzorcem $C_{12}H_{22}O_{11}$. Vlevo: Neredukující disacharid sacharóza, který vzniká vazbou 1,1 z monosacharidů α -D-glukózy a β -D-fruktózy. Obecný název sloučeniny je β -D-fruktofuranosyl- α -D-glukopyranosid. Vpravo: Redukující disacharidy α -maltóza a α -laktóza. Disacharid α -maltózy vzniká vazbou 1,4 mezi dvěma α -D-glukózami. Disacharid α -laktózy vzniká také vazbou 1,4 mezi monosacharidy β -D-galaktózy a α -D-glukózy. Obecný název α -laktózy je β -D-galaktopyranosyl-4- α -glukopyranóza [9].

Polysacharidy – složené sacharidy

Polysacharidy se skládají z několika set až tisíců podjednotek monosacharidů. Jejich řetězce mohou být lineární či větvené a propojení opět tvoří α -glykosidová nebo β -glykosidová vazba. V přírodě je nalézáme u rostlin a živočichů, podle toho je lze dělit na polysacharidy rostlinného původu a živočišného původu. Mezi polysacharidy rostlinného původu patří triviálním názvem označovaná celulóza, dále např. škrob, inulin a deriváty sacharidů jako jsou pektiny a kyselina alginová. K polysacharidům živočišného původu patří glykogen, chitin, heparin, bakteriální polysacharidy a např. derivát kyselina hyaluronová. Polysacharidy nejsou rozpustné ve vodě a nechutnají sladce. Lze je kyselou hydrolyzou štěpit na monosacharidové složky [5].

Podle chemického složení dělíme polysacharidy na **monopolysacharidy** tvořené molekulami pouze monosacharidů a na **heteropolysacharidy**, které tvoří více monosacharidů a jejich deriváty. K homopolysacharidům řadíme škrob, glykogen (živočišný škrob), celulózu, dextran, inulin a další. Do skupiny heteropolysacharidů patří glykosaminoglykany, hyaluronová kyselina, heparin, agar, vláknina, hemicelulóza, pektiny, dále také rostlinné slizy a další [5].



Obrázek B.6 Haworthovy vzorce stavebních jednotek některých polysacharidů [9].

B.2 Důkazy sacharidů

Chemické reakce¹⁹ sacharidů jsou založeny na schopnosti tvorby furfuralu a jeho derivátů a na reaktivitě hydroxylových a karbonylových sloučenin. Vhodnými kombinacemi kvalitativních reakcí je možné určit složení neznámých směsí cukrů. Velmi využívanou metodou k identifikaci sacharidů je chromatografie. Kromě chromatografie je zde velice využívána také spektrofotometrie. Sacharidy jsou opticky aktivní látky, jsou schopny stáčet rovinu polarizovaného světla. K tomu využívají metody polarimetrie. V následující kapitole budou probrány metody používané k identifikaci a stanovení sacharidů, v celé kapitole je čerpáno ze zdrojů [10].

Reakce založené na tvorbě furalu a jeho derivátů jsou způsobené dehydratací sacharidů minerálními kyselinami. Na základě složitých chemických reakcí vzniká charakteristické zbarvení produktu. Dalším typem reakcí jsou *reakce oxidačně redukční* založené na redukujícím účinku karboxylové skupiny. Mezi nejpoužívanější oxidačně redukční reakce patří redukce měďnatých solí na Cu_2O (oxid měďný). Na tomto principu je založena Fehlingova, Benediktova a Trommerova reakce, více informací o metodách najdete níže v této kapitole. Reakce s jodem je založena na výrazném modrém zbarvení amylozy v kontaktu s jodem. Koncentrace sacharidů v roztocích by měla být 1 mol/l u všech metod.

Tymolová reakce

Důkaz sacharidů na základě červeného až fialového zbarvení. Do tří různých zkumavek dáme vzorky. Použijeme např. 0,5 ml roztoku sacharózy, 3 cm³ škrobového mazu a neznámý vzorek. Do každé zkumavky přidáme 3 kapky, 3% alkoholického roztoku, tymolu a směs podvrstvíme kyselinou

¹⁹ Během chemických reakcí probíhá oxidace a redukce prvků a sloučenin. Při oxidaci dochází ke ztrátě elektronů, tedy navýšení oxidačního čísla. Při redukci naopak dochází k příjmu elektronů, tedy poklesu oxidačního čísla [11].

chlorovodíkovou, asi 3 ml. Poté vaříme po dobu pěti minut a dojde ke karmínově červenému zbarvení na rozhraní vrstev.

Molischova reakce

Reakci provedeme např. s roztokem laktózy, glukózy a s neznámým vzorkem. Ke každému vzorku přidáme 3 kapky *Molischova činidla*, roztok 1-naftolu, a podvrstvíme stejným množstvím kyseliny sírové. Na rozhraní se vytvoří jasně fialové zbarvení. Provádíme v digestoři.

Fehlingova zkouška

K 0,5 ml roztoku sacharidu přidáme 0,5 ml Fehlingova činidla I (67 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ tzv. modrá skalice doplněná vodou do 1 litru) a 0,5 ml Fehlingova činidla II (346 g vinanu draselno-sodného se 104 g NaOH doplněných vodou do 1 litru). Pokud je ve vzorku přítomný sacharid, po opatrném povaření vzniká červená sraženina Cu_2O . Používá se převážně k identifikaci glukosy v moči.

Benediktova zkouška

K 1 ml roztoku sacharidů ve zkumavce přidáme 3 ml Benediktova činidla (86,5 g citrátu trisodného se 100 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ a 8,7 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ doplněno vodou do 500 ml). Vzorek poté dvě minuty povaříme. Pokud je ve vzorku přítomný sacharid, po opatrném povaření vzniká červená sraženina Cu_2O , stejně jako u Fehlingovy zkoušky. Používá se převážně k identifikaci glukosy v moči.

Reakce s jodem

K 0,5 ml roztoku sacharidů přidáme kapku Lugolova roztoku (15 g jodu s 30 g KI doplníme do 1 litru vodou). Je-li ve vzorku přítomen škrob vzniká modré zbarvení. Červené zbarvení nás informuje o přítomnosti glykogenu či svědčí o částečném štěpení řetězce polysacharidů. K reakci použijeme neznámý vzorek a škrob.

Chromatografie sacharidů

Tato metoda je dnes naprosto nepostradatelnou součástí identifikace sacharidů, ale i dalších látek. Pomocí této metody je možné získat kvalitativní a kvantitativní informace. Pro úplnou identifikaci je však nutné propojení s metodami spektrometrie. U všech typů chromatografických separací oddělujeme *stacionární* a *mobilní fázi*. Mobilní fáze je buď plyn nebo kapalina, stacionární fáze má odlišné formy (např. tenká vrstva kapaliny, tzv. částčky tuhé fáze), proto vznikl pojem *sorbent*, který zahrnuje všechny formy stacionárních látek.

Během chromatografického dělení dochází k opakovanému transportu složek z mobilní fáze do stacionární fáze a zpět. Rozdělovací konstanta K (koeficient) popisuje rozdělení fází chromatografického systému při přiblížení rovnovážnému stavu:

$$K = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s \times V_m}{(n_A)_m \times V_s}, \quad (\text{B.2.1})$$

kde K vyjadřuje poměr rovnovážných koncentrací složky A v obou fázích. $[A]_s$ vyjadřuje koncentraci stacionární fáze, $[A]_m$ vyjadřuje koncentraci mobilní fáze, $(n_A)_s$ je látkové množství stacionární fáze, $(n_A)_m$ je látkové množství mobilní fáze, V_s je objem stacionární fáze a V_m je objem mobilní fáze.

Principem chromatografického dělení je vznik podskupin na základě rozdílné afinity²⁰ částic mobilní fáze, např. dochází k odlišné adsorpci látek. Existuje mnoho variant chromatografických metod. Jedním z dělících kritérií je skupenství fází. Metody dělíme na *kapalinovou chromatografii* a *plynovou chromatografii*. Plynová chromatografie pracuje v systému plyn-pevná látka nebo plyn-kapalina, ale kapalinová chromatografie pracuje v systému kapalina-kapalina nebo pevná látka-kapalina. Dalším kritériem jsou separační mechanismy neboli charakter interakce. Rozlišujeme tak **chromatografii adsorpční, ionexovou, rozdělovací, afinitní**.

Tabulka B.1 Přehled nejdůležitějších metod v chromatografii [9].

Mobilní fáze	Separační mechanismus	Metoda	Užívaná zkratka
Plyn	Síťový efekt	Plynová chromatografie na molekulových sítích	GSC
	Adsorpce	Plynová adsorpční chromatografie	
	Rozdělování	Plynová rozdělovací chromatografie	GLC
Kapalina	Síťový efekt	Gelová permeační chromatografie	GPC
	Adsorpce	Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	Rozdělování	Kapalinná rozdělovací chromatografie	LLC
	Chemisorpce	Iontová výměnná chromatografie	IEC
	Specifická interakce biomolekul	Afinitní chromatografie	

Adsorpční chromatografie je založena na odlišné adsorpci látek na vrstvě adsorbentu (např. silikagel), tím dochází k separaci. *Rozdělovací chromatografie* je charakteristická výše zmíněnou rozdělovací konstantou K , založena je na principu dvou navzájem nemísitelných látek či omezeně mísitelných rozpouštědel. Mobilní fáze protéká přes stacionární fázi zakotvenou na pevném nosiči a látky s vyšší afinitou (z obou fází) se na daném nosiči separují a ukotvují. Ionexová chromatografie je založena na iontových interakcích mezi iontoměničem a separovanou látkou, ta nese opačný náboj.

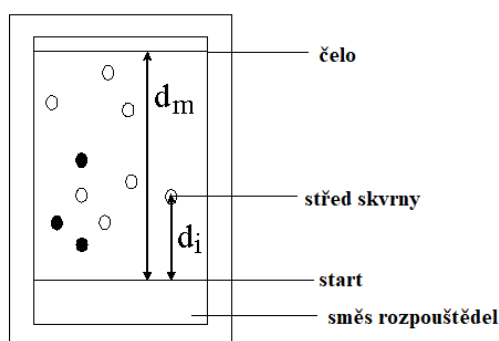
Posledním kritériem dělení je technika provedení metody. Známe **sloupcovou chromatografii, papírovou chromatografii a chromatografii na tenké vrstvě (TLC)**. U sloupcové metody je materiál uzavřen v chromatografické koloně (skleněná či kovová trubice). Ve sloupci látky dochází za určitých podmínek k separaci. Používaná je převážně sloupcová metoda fungující při zvýšeném tlaku. Kromě kolony je k metodě potřebný také spektrofotometr. Papírová chromatografie je nejjednodušší metodou chromatografie, ale dnes se příliš nepoužívá, jelikož je velice pomalá. Sorbentem je zde chromatografický papír. U TLC metody je sorbent rozložen v tenké vrstvě na desce z nereagujícího materiálu.

²⁰ Afinita popisuje vzájemný vztah atomů látek a jejich ochotu vzájemně interagovat [13].

Papírová chromatografie je druhem rozdělovací chromatografie. Na papír, který poté vložíme do vyvíjecí komory, nanese vzorky standardních sacharidů a neznámou směs. Nanese asi 3 kapky na tzv. start ve formě kružnicových oblouků, tak aby se start nacházel nad hladinou vyvíjecí směsi. Před začátkem pokusu vzorky vysušíme. Do vyvíjecí komory připravíme mobilní fázi (směs rozpouštědel), na základě rozdílného vzlínání analyzovaných látek a směsi rozpouštědel určíme tzv. retardační faktor R_F .

$$R_F = \frac{d_i}{d_m}, \quad (\text{B.2.2})$$

kde retardační faktor R_F je poměr vzdálenosti středu skvrny i-tého analytu od startu (d_i) a vzdálenosti čela mobilní fáze od startu (d_m). Faktor je větší u složitějších sacharidů, ale celkově nepřesahuje hodnotu 1, jelikož všechny sacharidy jsou rozpustné v organických rozpouštědlech. K výraznějšímu rozdělení směsi dochází při delší vyvíjecí době, vyvíjení lze nechat běžet přes noc. Velikost retardačního faktoru určuje charakteristickou sloučeninu.



Obrázek B.7 Schéma metody papírové chromatografie. Podle [9].

B.3 Význam sacharidů

Sacharidy jsou důležitými komponenty stavby a funkce všech živých organismů. Nejznámějšími stavebními sacharidy jsou polysacharidy chitin a celulóza. K zásobním polysacharidům patří glykogen, inulin či živočišný škrob. Fruktóza a glukóza jsou zdrojem energie. Zvláštní funkci mají např. i kyselina hyaluronová a heparin. Některé sacharidy jsou součástí hormonů, koenzymů a nukleonových kyselin. Rostliny si sacharidy vyrábí pomocí fotosyntézy, ostatní organismy je přijímají ve formě potravy. U organismů může dojít vlivem nemocí či jiných vlivů k nerovnováze sacharidů, deficitu nebo nadbytku. Proto jsou využívány laboratorní metody k jejich identifikaci. Významná je pro zdravotní stav člověka např. glykémie. Glykémie je koncentrace glukózy v krvi. Její hodnoty by se při normálním fyziologickém stavu měly pohybovat v rozmezí 3,3–5,6 mmol/l nalačno v celé krvi. Při poruše metabolismu hormonu inzulinu v těle dochází k hypoglykémii (nedostatku krevního cukru) nebo hyperglykémii (nadbytku krevního cukru). Od toho se odvíjí onemocnění diabetes mellitus a další zdravotní problémy. Diabetes mellitus neboli cukrovka je časté metabolické onemocnění. Diabetici jsou ohroženi vyšší pravděpodobností selhání jater nebo také předčasným rozvojem aterosklerózy²¹. Cukrovka se dá diagnostikovat pomocí močové glukometrie, jelikož při hyperglykémii dochází ke glykosurii, nadbytečnému vylučování cukru močí, [3] a [4].

²¹ Ateroskleróza je onemocnění, při kterém dochází k ucpání cév vlivem usazování tuků do cévních stěn [4].

Dodatek C. Lipidy

Lipidy jsou ve vodě nerozpustné látky, naopak jsou rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (chloroformu). Funkcí a strukturou se liší od ostatních látek živočišného a rostlinného původu. Z chemického hlediska se jedná o estery²² vyšších karboxylových kyselin (mastných kyselin a alkoholu) nebo amidy mastných kyselin a sfingosinu, což je aminoalkohol. Rozlišujeme, jestli je lipid složený z nasycených či nenasycených mastných kyselin. Obecně je dělíme na jednoduché a složené lipidy. K jednoduchým lipidům patří tuky a vosky. Mezi složenými lipidy jsou např. fosfolipidy, glykolipidy, glycerofosfolipidy, sfingofosfolipidy, glykosfingolipidy a některé isoprenoidy [11].

C.1 Struktura a dělení lipidů

Základní složku lipidů tvoří mastné kyseliny, což jsou alifatické monokarboxylové kyseliny²³, které tvoří převážně nerozvětvené řetězce. Řetězce mají většinou sudý počet uhlíků, jelikož se skládají z dvojuhlíkatých jednotek acetylkoenzymu A ($\text{CH}_3\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$). Podle délky uhlíkatého řetězce jsou klasifikovány jako **nižší mastné kyseliny**, mají-li do 10 atomů uhlíku, a jako **vyšší mastné kyseliny**, mají-li 12 a více uhlíkových atomů. Dle přítomnosti a počtu dvojných vazeb v uhlíkatých řetězcích jsou kyseliny rozlišovány na **nasycené** (nemají dvojnou vazbu), **mononenasycené** (mají jednu dvojnou vazbu) a **polynenasycené** (mají více dvojných vazeb) [5].

Tabulka C.1 Přehled vybraných mastných kyselin [5].

Vybrané nasycené mastné kyseliny (SFA)			
Zkrácený zápis	Triviální název		Systematický název
4:0	máselná		butanová
6:0	kapronová		hexanová
12:0	laurová		dodekanová
14:0	myristová		tetradekanová
16:0	palmitová		hexadekanová
18:0	stearová		oktadekanová
Vybrané nenasycené mastné kyseliny (MUFA, PUFA)			
Zkrácený zápis	Řada	Triviální název	Systematický název
16:1 (9)	<i>n</i> −7	palmitolejová	hexadec-9-enová
18:1 (9)	<i>n</i> −9	olejová	oktadec-9-enová
18:2 (9, 12)	<i>n</i> −6	linolová	oktadeka-9, 12-enová

²² Organické sloučeniny, ve kterých je hydroxylová skupina karboxylové kyseliny nahrazena zbytkem alkoholu po odštěpení vodíku, se nazývají estery. Jsou to alkoholy, u nichž je vodík nahrazen acylovou skupinou [10].

²³ Přírodní lipidy obsahují až 300 alifatických kyselin, kde jsou alifatické kyseliny definovány jako nearomatické (necyklické) sloučeniny, které tvoří řetězce uhlíků, vodíků, kyslíků, ale i dalších prvků [11].

K zápisu názvů mastných kyselin využíváme zkrácený zápis. Jeho tvar definuje počet uhlík v řetězci v poměru k počtu dvojných vazeb v uhlíkatém řetězci. Po zapsání poměru se do závorky uvádí číslo uhlíku, na kterém dvojná vazba začíná. Řada uvádí polohu poslední dvojně vazby od posledního uhlíku, kde n reprezentuje celkový počet uhlíků řetězce [5].

Dalšími složkami lipidů jsou alkoholy. K nejvýznamnějším patří glycerol, sfingosin, cholesterol. Ve složených lipidech dále lze najít sacharidy, kyselinu fosforečnou nebo dusíkaté látky. Tuky tvoří obecně ochrannou vrstvu. Lze je rozložit alkalickou hydrolýzou na mýdla, proces nazývaný zmýdelnění, a enzymovou hydrolýzou pomocí lipázy, což je enzym podporující hydrolýzu tuků [11].

Jednoduché lipidy

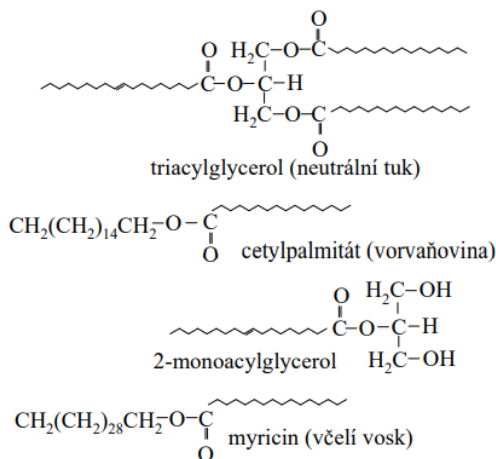
K nejznámějším podskupinám jednoduchých lipidů patří tuky a vosky, fosfolipidy, glykolipidy a některé isoprenoidy. V této kapitole je čerpáno z [11].

Tuky jsou estery vyšších karboxylových kyselin a glycerolu, což je trojmocný alkohol. K esterifikaci dochází u všech tří hydroxylové skupin glycerolu, proto se jedná o triglyceroly. Triglyceroly mohou obsahovat stejné acylové zbytky, nebo mohou být hydroxylové skupiny esterifikovány jinými kyselinami. Přírodní lipidy jsou tvořeny převážně kyselinou palmitovou, linolovou a olejovou. Podle skupenství lze tuky dělit na pevné, tvořené spíše nasycenými kyselinami, a oleje, jež jsou kapalné a obsahují více nenasycené mastné kyseliny. Obecně platí, že tuky jsou převážně živočišného původu a oleje spíše rostlinného původu.

Mezi známé tuky patří např. vepřové sádlo nebo lůj. Oleje dělíme na nevysychavé, kam patří olivový olej, mandlový olej a další, polovysychavé, kam řadíme řepkový olej, slunečnicový olej a podzemnicový olej, a vysychavé, zde je typicky známý např. lněný a makový olej.

Vosky

Vosky jsou chemicky estery vyšších alifatických kyselin a primárních či sekundárních alifatických alkoholů. Vosky jsou stálé sloučeniny, které jsou těžko hydrolyzovatelné, rozkladné. Při normálních teplotách mají pevné skupenství, s vyšší teplotou dochází k jejich měknutí a tání. Vosky jsou rostlinného i živočišného původu. Rostlinné vosky tvoří ochrannou vrstvu rostlinných orgánů, tzv. kutikulu. K živočišným voskům patří včelí vosk, bílý i žlutý, vorvaňovina a další, viz Obrázek C.1 Řetězce vybraných tuků a vosků [9].



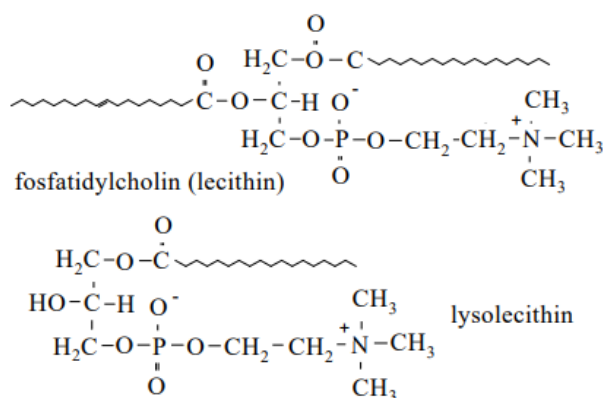
Obrázek C.1 Řetězce vybraných tuků a vosků [9].

Složené lipidy

Skupina složených lipidů obsahuje nepolární část tvořenou alkoholem a mastnou kyselinou, na kterou se váže polární část molekuly, mají tedy polárně-nepolární charakter. Rozsah polarity je veliký, od nejméně polárních (neutrálních) glykolipidů až po ionizované dipolární glykolipidy a fosfolipidy. Ke složeným lipidům patří např. fosfolipidy, glykolipidy, sulfolipidy, sfingolipidy, lipoproteiny, glycerofosfolipidy a sfingofosfolipidy.

Fosfolipidy

Fosfatidy neboli fosfolipidy jsou chemicky diestery kyseliny fosforečné (H_3PO_4). Kyselina je esterifikována pomocí aminoalkoholu, sfingosinu nebo, trojmocného alkoholu, glycerolu, ale zároveň je esterifikována cholinem, ethanolaminem, serinem či glycerolem. Podle druhu sekundární esterifikace mají vzniklé fosfolipidy různé vlastnosti. V případě, že je hlavním alkoholem primární esterifikace sfingozin, mluvíme o sfingofosfolipidech. Je-li základem glycerol, jedná se o glycerofosfolipidy, viz Obrázek C.2.



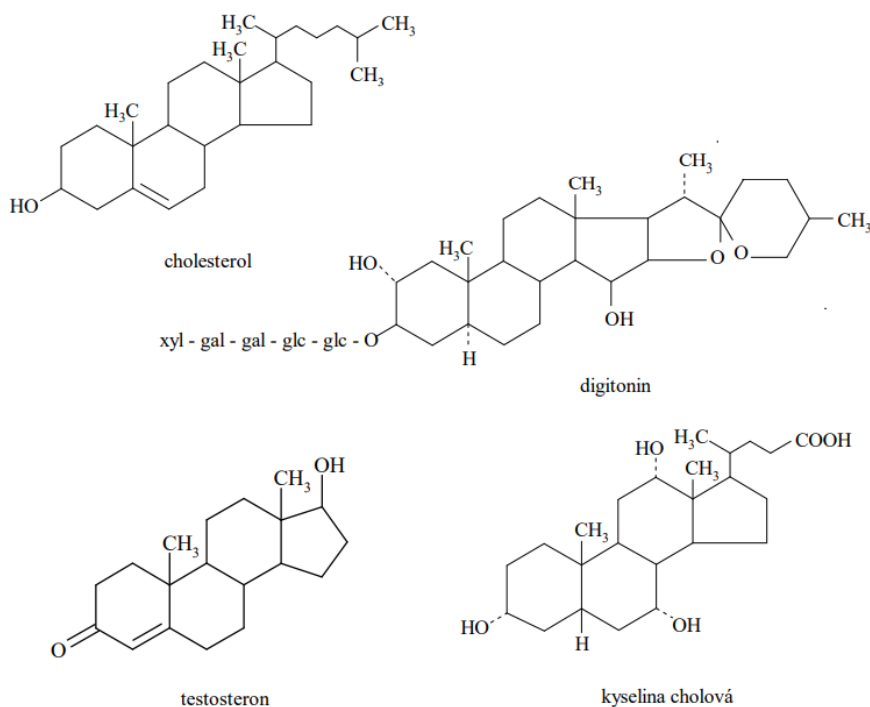
Obrázek C.2 Řetězce vybraných glycerofosfolipidů [9].

Glykolipidy

Tato skupina glykolipidů obsahuje monosacharidový nebo oligosacharidový zbytek navázaný nejčastěji na alkoholu sfingosinu. Základem je 1,2-diacylglycerol, který má na třetím uhlíku vázaný sacharidový zbytek.

Isoprenoidní lipidy

K isoprenoidním lipidům patří speciální skupiny steroidů a terpenů. Základem steroidů je cyklický uhlovodík steran. Steroidní strukturu má mnoho životně důležitých látek. K nejznámějším patří vitamín D, cholesterol a hormony, viz Obrázek C.3.



Obrázek C.3 Řetězce vybraných steroidů [9].

C.2 Důkazy lipidů

Postupů, kterými lze identifikovat přítomnost lipidů, je mnoho. V této kapitole bude uvedeno pár z nich, včetně metod, které budou podrobně popsány a zpracovány v praktické experimentální části této práce. Tato kapitola čerpá ze zdrojů [12].

Preparace lipidových frakcí z vaječného žloutku

Vaječný žloutek je zdrojem, velice známého fosfolipidu, lecitinu, dále obsahuje sfingolipidy a neutrální tuky, ale také bílkoviny. K frakci²⁴ poté dochází pomocí acetonu, který odstraní neutrální tuky, a 95% ethanolu, který extrahuje fosfolipidy. Obsah jednotlivých složek ve vzorku je závislý na použitém rozpouštědle. Lecitin lze ze žloutku vysrážet pomocí chloridu kadmátového (CdCl_2). Frakční metody se využívají převážně k extrakci neutrálních lipidů, izolaci fosfolipidů, odstranění tuků v mýdlové formě a k izolaci cholesterolu.

²⁴ Frakce je proces separace a extrahování jednotlivých složek sloučeniny. Frakcí je získán produkt v důsledku odstranění zbylých složek [12].

Identifikace lipidů

Lecitin lze hydrolyzou rozštěpit na glycerol, vyšší mastné kyseliny, kyselinu fosforečnou a dusíkatou organickou bázi. Tento proces je velice důležitý, jelikož uvedené složky lze v hydrolyzátu neboli v produktu hydrolyzy dokázat. Mastné kyseliny lze dokázat pomocí zmýdelnění, glycerol zase nitrochromovou reakcí a kyselinu fosforečnou jako fosfomolybdenan amonný, poskytující žluté zbarvení, který se po redukci zbarví do modra.

Hydrolyza lecitinu

5 ml 10% vodného roztoku hydroxidu sodného (NaOH) se 100 mg lecithinu zahříváme ve zkumavce po dobu 15 minut, nejlépe na vodní lázni. Hydrolyzát ochladíme, přidáme kyselinu octovou tak, aby konečné pH bylo 6 a pomocí filtru odstraníme vyloučené mastné kyseliny. Metody se využívá k identifikaci důkazu cholinu a kyseliny fosforečné pomocí mikroskopu.

Při dokazování cholinu smícháme kapku hydrolyzátu s kapkou Lugolova roztoku²⁵ na podložním sklíčku a sledujeme růst hnědých krystalků pod mikroskopem. Přidáme-li 2 ml 2% reineckátu amonného, dojde k tvorbě růžových krystalků reineckátu cholinu.

Pro důkaz kyseliny fosforečné nám postačí 1 ml hydrolyzátu a přidáme pár kapek molybdenanu amonného. Dojde k tvorbě žlutého fosfomolybdenanu amonného, který se pomocí chloridu cínatého redukuje a vytváří modré zbarvení, tzv. fosfomolybdenovou modř.

Důkaz cholesterolu Liebermannovou-Burchardovou reakcí

Několik krystalků cholesterolu rozpustíme ve 2 ml dichlormethanu a přidáme asi 1 ml anhydridu kyseliny octové. Dále opatrně přidáme 0,5 ml kyseliny sírové. Po promíchání dojde k modrozelenému zbarvení, které je charakteristické pro přítomnost cholesterolu ve vzorku.

Ke stanovení lipidů lze dále použít např. **metody spektrofotometrické**. Jejich hlavní výhodou je rychlá a nedestruktivní analýza. U stanovení lipidů se využívá reflexní fotometrie. Při této technice zaznamenáváme odražené záření od homogenně zbarvené podložky.

Naposlední metodou identifikace lipidů je **stanovení jodového čísla tuku**. Jodové číslo tuku je určené množstvím jodu v gramech, které se naváže na 100 g tuku. Je také mírou počtu dvojných vazeb u mastných kyselin v tucích. Stanovení probíhá pomocí nepřímé jodometrie, která využívá Winklerova činidla tvořeného bromičnanem a bromidem draselným.

C.3 Význam lipidů

Triacylglyceroly jsou zdrojem energie živých organismů, také jsou součástí biologických membrán, tvoří tepelnou izolaci organismů a jsou součástí tvorby vitamínů a hormonů. Tuky tvoří základ mastí a slouží jako krycí a dráždicí prostředky ve farmacii. Také se využívají k výrobě barviv, laků a mýdel. Pro člověka mají význam obrovský, jelikož jsou součástí hormonů, enzymů a důležitých vitamínů. Glykosfingolipidy jsou velice důležité pro správnou funkci mozku a dalších orgánů, např. sleziny, jater a jiných orgánů. Zvýšené množství sulfatidů, esterů neutrálních glykosfingolipidů, je charakteristické pro metabolické poškození mozku. Ze speciální skupiny tzv. gangliosidů je tvořena šedá kůra mozková

²⁵ Roztok tvoří 10 g jodidu draselného a 5 g jódu, které doplníme do 100 ml vodou [12].

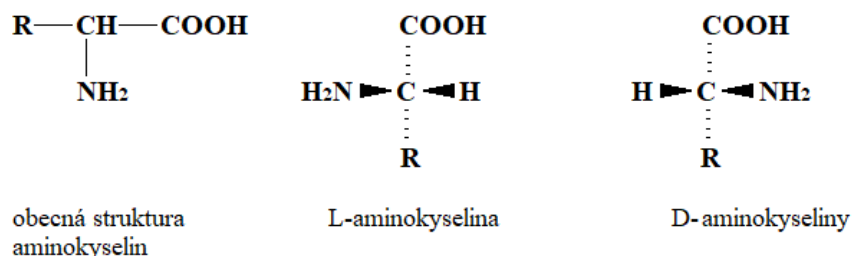
a jejich přítomnost hraje velkou roli při zachycení virových částic pronikajících do buněk. Lipidy jsou také obsaženy v plazmě, kde tvoří lipoproteiny. Lipoproteiny se tvoří v tenkém střevě a v játrech. Jejich hlavní funkcí je transport lipidů v plazmě, při narušení jejich koncentrace dochází např. ke zvýšené koncentraci cholesterolu, což zvyšuje riziko srdečního infarktu [4].

Dodatek D. Aminokyseliny

Kapitola o aminokyselinách se bude převážně věnovat dvaceti aminokyselinám, ze kterých vznikají proteiny a označují se jako **kódované** (standardní). Některé aminokyseliny musí být živým organismem přijímány v potravě, označují se jako **esenciální** (nepostradatelné). Pro člověka je esenciálních těchto devět aminokyselin: valin, leucin, izoleucin, tryptofan, methionin, lysin, threonin, fenylalanin a histidin [5]. Aminokyseliny jsou základními stavebními kameny peptidů a proteinů a dalších sloučenin. Peptidy obsahují řetězec 2–100 aminokyselin, zatímco proteiny tvoří řetězec více než 100 aminokyselin. Důležitou hodnotou týkající se acidobazické vlastnosti aminokyselin je izoelektrický bod [14].

D.1 Struktura a dělení aminokyselin

Standardní proteinogenní aminokyseliny se skládají z karboxylové kyseliny, ale také aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) navázané na α -uhlíku, tj. uhlík sousedící s karboxylovou skupinou ($-\text{COOH}$). Dále ve struktuře můžeme najít hydroxylové ($-\text{OH}$), sulfhydrylové ($-\text{SH}$), sulfidové ($-\text{S}-$) a další funkční skupiny. Stejně jako sacharidy jsou to, kromě glycinu, opticky aktivní látky, jelikož α -uhlík je chirálním centrem. Isoleucin a threonin mají i druhé centrum chiralit. K tvorbě řetězců jsou využívány aminokyseliny, jež mají na α -uhlíku L-konfiguraci. Obecně se struktura aminokyselin liší jen čtvrtým substituentem na α -uhlíku, ten je ve vzorcích označován jako $-\text{R}$. Nazýváme jej *postranním řetězcem*, viz Obrázek D.1 [14].



Obrázek D.1 Zobrazení struktury aminokyselin a jejich konfigurace. Podle [5].

Všechny aminokyseliny lze klasifikovat podle vzdálenosti aminoskupiny od karboxylové skupiny. Dělíme je na α -aminokyseliny, kde je aminoskupina hned vedle skupiny karboxylové, β -aminokyseliny, které jsou od karboxylové skupiny vzdálenější o jeden uhlík, γ -aminokyseliny, vzdálené o dva uhlíky, a další. Dále je lze dělit podle výskytu na invariabilní, přítomné ve všech organismech, a na variabilní, ty jsou přítomny jen u některých organismů a řadíme sem např. proteinogenní selenocystein a pyrrolysin [14].

Při standardních fyziologických podmínkách dělíme aminokyseliny podle polarit do následujících čtyř skupin:

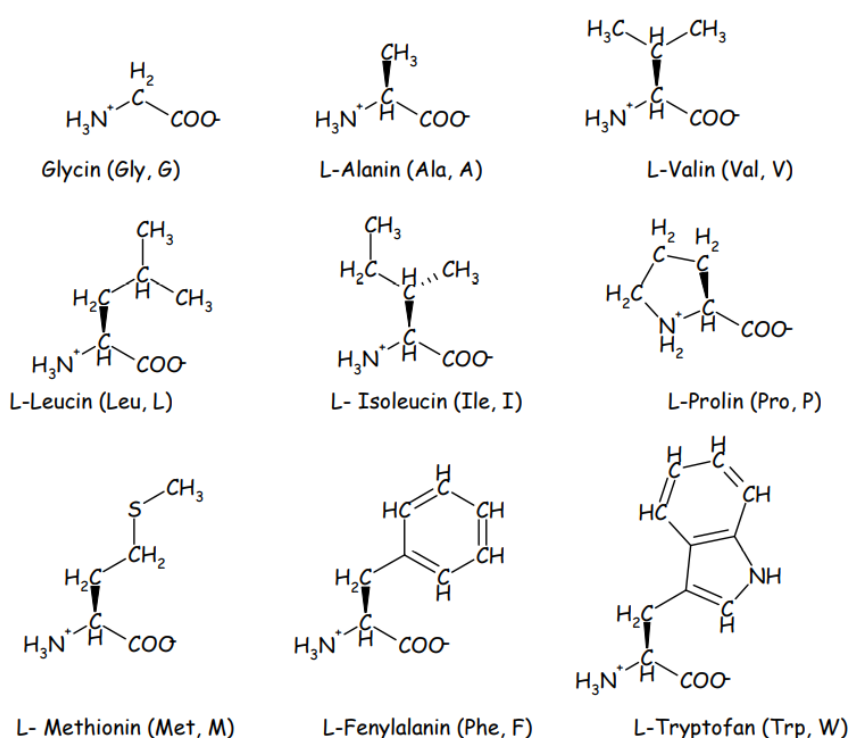
- aminokyseliny hydrofobní s **nepolárním** postranním řetězcem
- aminokyseliny hydrofilní s **polárním** postranním řetězcem
- **bazické** aminokyseliny (zásaditá skupina v postranním řetězci)
- **kyselé** aminokyseliny (karboxylová skupina v postranním řetězci)

Nepolární aminokyseliny

Aminokyseliny s nepolárním řetězcem jsou hydrofobní sloučeniny, neinteragují s vodou. Patří sem glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, fenylalanin, prolin, tryptofan a methionin, viz Tabulka D.1 a Obrázek D.1 [5].

Tabulka D.1 Přehled aminokyselin s nepolárním postranním řetězcem. Podle [5].

Triviální název	Systematický název	Třípísmenný symbol	Jednopísmenný symbol
glycin	aminooctová	Gly	G
L-alanin	L-2-aminopropionová	Ala	A
L-valin	L-2-amino-3-methylmáselná	Val	V
L-leucin	L-2-amino-4-methylvalerová	Leu	L
L-isoleucin	L-2-amino-3-methylvalerová	Ile	I
L-methionin	L-2-amino-4-methylthiomáselná	Met	M
L-fenylalanin	L-2-amino-3-fenylpropionová	Phe	F
L-tryptofan	L-2-amino-3-(3-indolyl)propionová	Trp	W
L-prolin	L-pyrrolidin-2-karboxylová	Pro	P



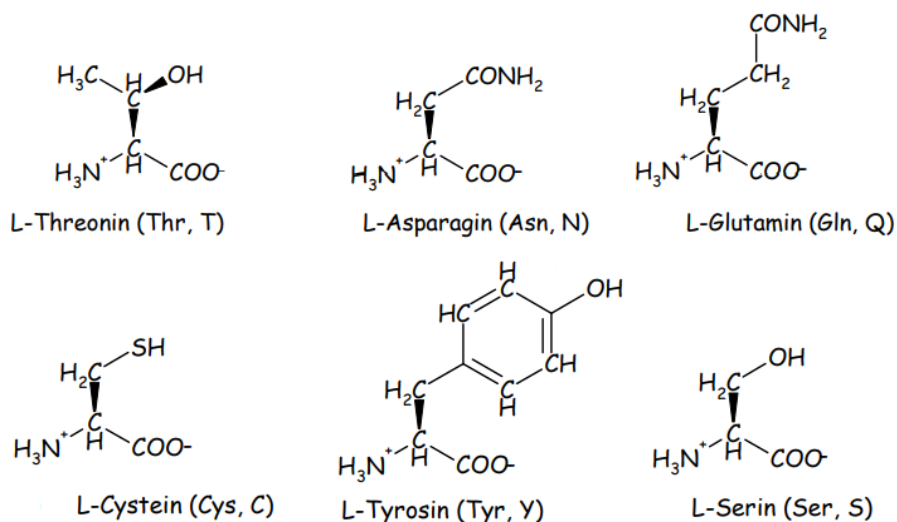
Obrázek D.2 Struktura nepolárních aminokyselin. Glycin je nejjednodušší aminokyselina a není chirální, proto není uvedena konfigurace. Převzato z [5].

Polární aminokyseliny

Aminokyseliny s polárním řetězcem jsou hydrofilní sloučeniny, interagují s vodou. Patří sem serin, asparagin, tyrosin, cystein, threonin a glutamin, viz Tabulka D.2 a Obrázek D.3 [5].

Tabulka D.2 Přehled aminokyselin s polárním postranním řetězcem. Podle [5].

Triviální název	Systematický název	Třípísmenný symbol	Jednopísmenný symbol
L-serin	L-2-amino-3-hydroxypropionová	Ser	S
L-threonin	L-2-amino-3-hydroxymáselná	Thr	T
L-cystein	L-2-amino-3-merkaptopropionová	Cys	C
L-asparagin	L-2-amino-4-karbamoylmáselná	Asn	N
L-glutamin	L-2-amino-5-karbamoylvalerová	Gln	Q
L-tyrosin	L-2-amino-3(4-hydroxyfenyl)propionová	Tyr	Y



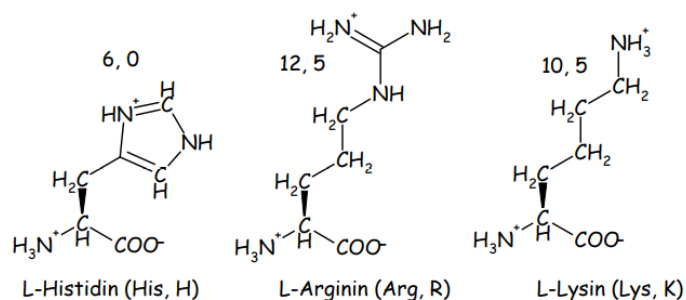
Obrázek D.3 Struktura polárních aminokyselin. Převzato z [5].

Bazické aminokyseliny

K bazickým aminokyselinám řadíme lysin, arginin a histidin, viz Tabulka D.3 a Obrázek D.4 na následující straně [5].

Tabulka D.3 Přehled bazických aminokyselin. Podle [5].

Triviální název	Systematický název	Třípísmenný symbol	Jednopísmenný symbol
L-lysin	L-2,6-diaminohexanová	Lys	K
L-arginin	L-2-amino-5-guanidylvalerová	Arg	R
L-histidin	L-2-amino-3-(4-imidazolyl)propionová	His	H



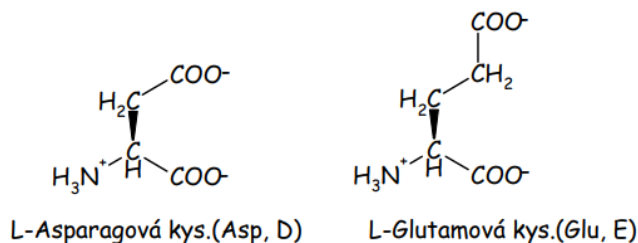
Obrázek D.4 Struktura bazických aminokyselin. Převzato z [5].

Kyselé aminokyseliny

Ke kyselým aminokyselinám řadíme asparagovou kyselinu a glutamovou kyselinu, viz Tabulka D.4 a Obrázek D.5 Struktura kyselých aminokyselin. Převzato z [5].

Tabulka D.4 Přehled kyselých aminokyselin. Podle [5].

Triviální název	Systematický název	Třípísmenný symbol	Jednopísmenný symbol
L-asparagová kyselina	L-aminojantarová	Asp	D
L-glutamová kyselina	L-aminoglutarová	Glu	E



Obrázek D.5 Struktura kyselých aminokyselin. Převzato z [5].

D.2 Peptidy

Nejdůležitější vlastností aminokyselin je schopnost tvořit řetězce za vzniku peptidů a proteinů. Mezi aminokyselinami vznikají tzv. **peptidové vazby** (–CO–NH–), které vznikají reakcí α -karboxylové skupiny jedné aminokyseliny s α -aminoskupinou aminokyseliny druhé. Při reakci dochází k vyloučení vody, tato reakce může probíhat i naopak. Příměs vody může peptidovou vazbu rozložit na původní aminokyseliny. Název peptidů je odvozen od názvů acylů aminokyselin, změně se pouze koncovky. Celá kapitola čerpá z [5] a [1].

Vybrané peptidy a jejich význam

Glutathion (GSH) je tripeptid vzniklý z cysteinu, obsahující skupinu –SH. Je považován za jeden z nejdůležitějších buněčných antioxidantů. Dále jsou důležité také peptidové hormony, jelikož většina hormonů produkovaných neurony hypothalamu je zařazená právě do peptidů. *Liberiny* a *statiny* ovlivňují sekreci adenohypofýzy. *Kalcitonin* je hormonem štítné žlázy a některé peptidy se tvoří např. i v myokardu. *Glukagon* vzniká v α -buňkách Langerhasových ostrůvků pankreatu a zabraňuje

hypoglykémii. *Insulin* vzniká v β -buňkách *Langerhasových ostrůvků pankreatu* a zabraňuje hyperglykémii, dnes je spíše zařazován k malým proteinům.

Neméně důležitá jsou peptidová antibiotika. K poměrně toxickým bakteriálním antibiotikům řadíme bacitraciny a gramicidiny. Jako imunosupresivum neboli inhibitor činnosti imunitního systému se využívá *cyklosporin A*. K onkologické léčbě zase *Antinomycin D*. Mezi peptidy najdeme i toxiny, nejznámějšími jsou *amanitiny* a *faloidiny*.

Peptidy vykazují mnoho různých a zajímavých účinků. Takový *aspartam* je zhruba 180x sladší než sacharóza. Je hojně využíván jako necukerné sladidlo, což se hodí např. u diabetiků.

D.3 Proteiny

Bílkoviny neboli proteiny jsou biopolymery polypeptidových řetězců L- α -aminokyselin. Pořadí a počet zbytků aminokyselin v proteinu udává genovou výbavu buněk. Proteiny jsou od peptidů rozdílné v počtu obsažených aminokyselin. Protein obsahuje více jak 100 aminokyselin v řetězci, v některých publikacích je uvedeno více než 50 aminokyselin. To ale není hlavní rozdíl. Hlavní odlišnost je kvalitativní. Řetězce proteinů mají specifické prostorové uspořádání tzv. **nativní konformace proteinu**. Procesem sbalování dochází ke skládání polypeptidového řetězce [5].

D.4 Struktura proteinů

V kapitole jsou rozebrány jednotlivé úrovně struktury proteinů. Čerpáno je ze zdrojů [1] a [5].

Primární struktura

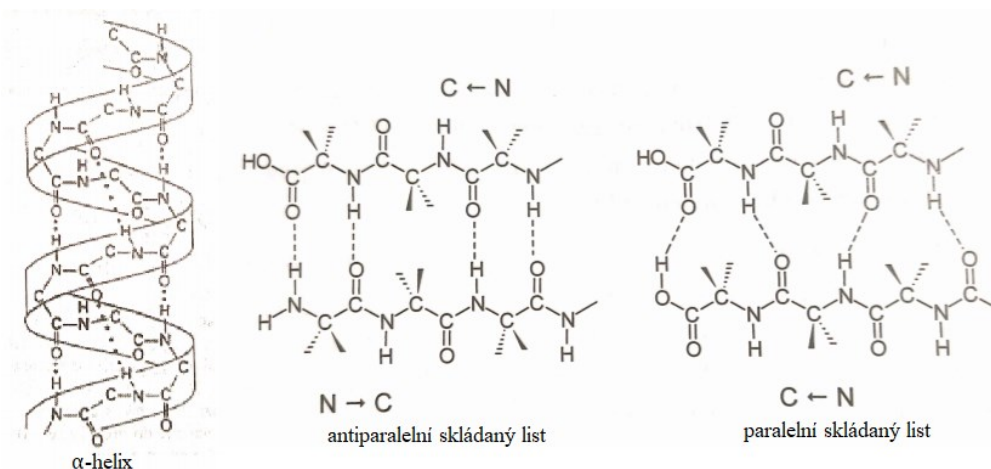
Geneticky podmíněná primární struktura popisuje **sekvenci** (pořadí) aminokyselinových zbytků v řetězcích. Sekvence aminokyselin se vždy udává od N-konce do C-konce u hlavního řetězce, v souhlasném směru se směrem syntézy proteinu.

Sekundární struktura

Zohýbání peptidového řetězce je označováno jako sekundární struktura. Ohyby nejsou náhodné, nýbrž vznikají v důsledku vazebných sil mezi úseky polypeptidového řetězce. Sekundární struktura popisuje segment polypeptidového řetězce. Udává **prostorové uspořádání atomů hlavního peptidového řetězce**, nebere ohled na uspořádání postranních řetězců. Teoreticky může řetězec zaujmout více poloh, ale energeticky nejvýhodnější je ta, kde jsou všechny $-NH-$ skupiny vázané pomocí vodíkového můstku s $-CO-$ skupinami. Strukturu lze popsat pomocí tzv. *torzních úhlů*. Úhly sledují rotaci modelu hlavního řetězce kolem vazeb vycházejících z α -uhlíků. Struktury lze dělit na *pravidelné, ohybové a nepravidelné*.

K významným pravidelným sekundárním strukturám proteinů patří **pravotočivý α -helix** (α -šroubovice), jelikož se vyskytuje u většiny proteinů. Strukturu si lze představit jako válec, jehož povrch pokrývají plošky peptidových vazeb stabilizované vodíkovými můstky. Je to struktura jednoho řetězce. Další významnou sekundární pravidelnou strukturou je **β -struktura** neboli β -skládaný list. Řetězec je z části roztažený do hřebenovité struktury a struktura vzniká mezi dvěma řetězci. Uspořádání je časté pro řetězce s velkým obsahem glycinu, alaninu a některých rozvětvených

aminokyselin. Roviny peptidových vazeb odstupují z řetězce střídavě nahoru a dolů, viz Obrázek D.6 Sekundární struktury. Ve strukturách jsou vyznačeny vodíkové můstky a směr syntézy proteinového řetězce. Převzato z [5].



Obrázek D.6 Sekundární struktury. Ve strukturách jsou vyznačeny vodíkové můstky a směr syntézy proteinového řetězce. Převzato z [5].

Terciární struktura

Struktura terciární je další strukturální úroveň proteinů a udává celkový tvar molekuly proteinu. Terciární struktura vzniká z důvodu existencí nekovalentních interakcí mezi úseky polypeptidových řetězců. Na interakci se podílí opět $-NH-$ skupiny s $-CO-$ skupinami a postranní řetězce aminokyselin. Terciární struktura popisuje **prostorové uspořádání všech atomů proteinu**. Udává jeho nativní konformaci a vnější tvar. Terciární struktura vyplývá z primární struktury, jelikož hledá co nejvýhodnější konformaci, a zároveň řeší prostorové uspořádání sekundární struktury. Terciární strukturu stabilizují interakce postranních řetězců. Mezi hlavní interakce patří disulfidové můstky, iontové interakce a hydrofobní interakce.

Kvartérní struktura

Struktura kvartérní je typická pro molekuly proteinů složené z několika podjednotek nezávislých polypeptidových řetězců. Kvartérní struktura pak udává **počet a prostorové uspořádání podjednotek v dané oligomerní molekule**. Podjednotky mohou být různé ale i identické. Příkladem proteinu s kvartérní strukturou je hemoglobin složený ze čtyř podjednotek.

D.5 Klasifikace proteinů

Kromě dělení proteinů na základě obsažené neproteinové složky na glykoproteiny, hemoproteiny, lipoproteiny a další, jsou v současné době tříděny do tří skupin: *globulární*, *membránové* a *fibrilární*. **Globulární proteiny** jsou velice početnou skupinou proteinů. Jsou rozpustné ve vodě, v roztoku existují jako samostatné nezávislé molekuly a mají oblý až kulovitý tvar. **Fibrilární proteiny** jsou málo početnou skupinou, ale jejich hlavní funkcí je tvorba vláken neboli fibril. Jsou nerozpustné ve vodě a tvoří základ vnitřní struktury buněk. Dodávají pevnost, pružnost a soudržnost pojivovým tkáním. **Membránové proteiny** jsou nedílnou součástí biomembrán. Některé z nich

membrány pouze stabilizují, jiné plní jejich biologické funkce. Zprostředkovávají např. transport látek [5].

Tabulka D.5 Přehled globulárních, fibrilárních a membránových proteinů. Podle [5] .

Proteiny	Příklady	Významné funkce
Globulární	Hemoglobin Myoglobin Albumin Imunoglobiny Pepsin Amyláza Karbonanhydráza	Nachází se v erythrocytech krve a jeho hlavní funkcí je přenos dikyslíku.
Fibrilární	Myozin F-aktin Keratin Kolagen Elastin Tubulin Spektrin	Hlavní složka povrchové vrstvy pokožky a kožních adnex (vlasy, nehty). Nejdůležitější složka mezibuněčné hmoty ve všech typech pojiv. Obsahově převažuje nad kolagenem v některých elastických pojivech.
Membránové	Glukózové transportéry Acetylcholinový receptor	

D.6 Identifikace aminokyselin

V této kapitole budou rozebrány některé reakce sloužící k identifikaci aminokyselin ve vzorcích. Některé jsou identické i pro stanovení proteinů, jelikož jsou aminokyseliny jejich podjednotkami, proto nebudou v této práci už znovu rozebrány. Kapitola čerpá z [13].

Xantoproteinová reakce

Reakce se využívá k identifikaci aromatických aminokyselin. Je podmíněna nitrací aromatických jader, což je navázání nitroskupiny ($-\text{NO}_2$) na organický zbytek. Ke 2 ml roztoku bílkovin přidáme asi 1 ml koncentrované HNO_3 . Dojde k vyloučení bílé sraženiny, která se zbarví do žluta. Po ochlazení a alkalizaci pomocí NaOH dojde k charakteristickému oranžovému zbarvení.

Adamkiewiczova reakce

Přidáme-li k bílkovině několik kapek kyseliny glyoxalové ($\text{H}-\text{CO}-\text{CO}-\text{OH}$), vzniká charakteristické červenofialové zbarvení. Do zkumavky s bílkovinou přidáme asi 1 ml koncentrované kyseliny octové (CH_3COOH). Směs opatrně podvrstvíme kyselinou sírovou (H_2SO_4). Na styčné ploše mezi kapalinami se vytvoří červenofialová vrstva.

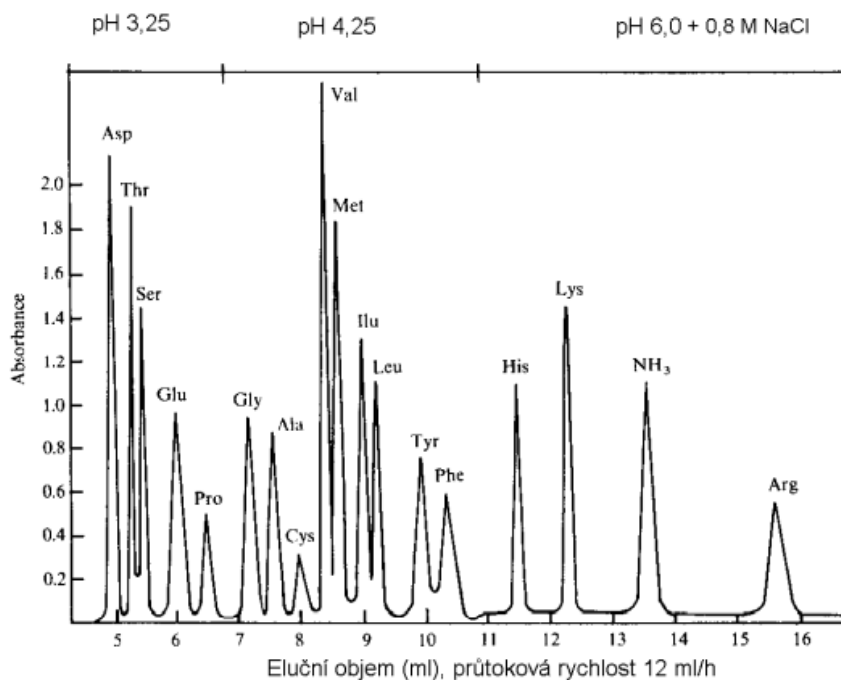
Dělení směsi aminokyselin pomocí chromatografie – na iontoměniči a na silikagelu

Chromatografie na iontoměniči s následnou identifikací aminokyselin adsorpční chromatografií na tenké vrstvě silikagelu je optimální metodou pro studentské laboratorní cvičení. Principem dělení směsi aminokyseliny u metody iontoměničové chromatografie je rozdíl v náboji jednotlivých aminokyselin. Iontoměniče jsou syntetické pryskyřice. Mají bazické (anexy) nebo kyselé (katexy) funkční skupiny. Na dělení aminokyselin se používají katexy obsahující sulfoskupiny ($-\text{SO}_3\text{H}$).

K rychlému určení interakce iontů s iontoměničem slouží celkový náboj iontu. Pro jeho výpočet platí:

$$\Delta p = pI - pH, \quad (\text{D.6.1})$$

kde pI značí izoelektrický bod (např. aminokyseliny) a pH je hodnota pH použitého pufru. Když je Δp pozitivní, aminokyselina nese kladný náboj. Aminokyselina s vyšším Δp je silněji vázána ke katexu. Když je Δp negativní, je aminokyselina odpuzována od katexu, protože nese negativní náboj.



Obrázek D.7 Dělení směsi aminokyselin na katexovém iontoměniči. Převzato z [9].

Chromatografii na silikagelu uskutečníme na tenké vrstvě na hliníkové folii zvané Silufol (5 x 15 cm). Jedná se o druh adsorpční chromatografie. Na Silufolu vyznačíme tužkou start asi 2,5 cm od okraje. Vzorky nanášíme jemnou kapilárou. Skvrny vzorků nesmí být v průměru větší než 3–5 mm. Folii vložíme do chromatografické komůrky s rozdělovací směsí, tzv. mobilní fází. Mobilní fáze vstupuje u startu. Čelo mobilní fáze se po určité době dostane 2 cm od konce folie. Nakonec fólii vyjmeme, vysušíme na vzduchu či opatrně fénem. Vyhodnocení probíhá na základě R_f faktoru, který byl v této práci už rozebrán.

D.7 Stanovení proteinů

Ke kvalifikaci proteinů existuje řada různých metod. Nejlepší postup kombinuje více metod založených na odlišných principech identifikace. Metody lze rozdělit do pěti základních skupin:

- metody založené na interakci proteinů s ionty mědi (nejznámější je biuretová reakce, Hartree-Lowryho metoda a Bichinchoninová metoda)
- ninhydridová metoda po kyselé proteinové hydrolýze
- stanovení z UV spektra
- metoda Bradfordové pomocí vazby Coomassie modře na protein
- stanovení celkových proteinů ze sušiny

Biuretová reakce

Biuretová reakce je využívána k důkazu peptidové vazby. Název reakce je odvozen od sloučeniny biuretu, což je produkt kondenzace dvou molekul močoviny za odštěpení amoniaku, tzv. tavení močoviny. Reakce spočívá ve tvorbě fialových měďnatých komplexů v alkalickém prostředí. Do suché zkumavky dáme několik krystalků močoviny a zahříváme na slabém plamenu. Po uvolnění amoniaku přerušíme zahřívání a necháme močovinu ztuhnout. Ke vzniklému biuretu přidáme asi 0,5 ml 10% NaOH. Poté zamícháme a přidáme několik kapek 1% roztoku CuSO₄. Po protřepání se objeví charakteristické fialové zbarvení vzniklého komplexu. Biuretová metoda je vhodná pro vzorky obsahující proteiny o koncentraci 1 až 10 mg/ml, které se ředí na konečnou koncentraci proteinu 0,2 až 2 mg/ml. Většina proteinů poskytuje tmavě červené zbarvení s maximem absorpce při 550 nm.

Hartree-Lowryho metoda

Lowryho metoda z roku 1951 patří k nejcitovanějším pracím v oboru biochemie. Stanovení je kolorimetrické, založené na dvousložkovém činidle. První složkou je biuretové činidlo²⁶, druhou složkou je Folin-Ciocalteu činidlo²⁷ na fenoly, které zbytky proteinů zabarví modře. Metoda má mnoho dalších modifikací a úprav, aby byla účinnější.

Stanovení z UV spektra – spektrofotometrie

Změříme absorpce vzorku obsahujícího protein při vlnové délce 205, 235, 260 a 280 nm, čistý vzorek tvoří destilovaná voda. Pro měření používáme křemennou kyvetu. V případě naměření vysokých hodnot absorpce zředíme vzorek. Dle následujících vzorců vypočteme koncentraci proteinu:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}, \quad (\text{D.7.1})$$

²⁶ Roztok tvoří 1,5 g pentahydrátu CuSO₄, 6 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného a voda doplněná do litru [9].

²⁷ Roztok tvoří 100 dihydrátu wolframanu sodného g jodidu draselného a 25 g molybdenanu sodného smíseného s vodou. Příprava celého roztoku je velice náročná i časově i složením [9].

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = (A_{235} - A_{280})/2,51, \quad (\text{D.7.2})$$

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = A_{205} \times [27 + 120 \times (A_{280} - A_{205})], \quad (\text{D.7.3})$$

kde A_{205} , A_{235} , A_{260} a A_{280} jsou absorbance vzorku při daných vlnových délkách.

Změřit celé UV absorpční spektrum, od 230 po 310 nm je velmi užitečné pro zjištění interferujících sloučenin. Pokud měříme čisté proteiny v kyselém pH, mělo by spektrum mít konvexní oblast kolem 250 nm, výrazný vrchol při 275 až 280 nm a velmi nízkou absorpci kolem 310 nm.

Metoda Bradfordové

Připravíme si sadu zkumavek o obsahu 1 ml standardního roztoku proteinu. Koncentrace roztoku proteinu v jednotlivých zkumavkách se bude pohybovat mezi 2,5 až 25 μg . Slepý vzorek obsahuje 1 ml vody. Ke každé zkumavce přidáme 2 ml činidla Bradfordové²⁸ a rychle promícháme. Po 5 minutách měříme absorbanci při 595 nm. Stejným způsobem změříme obsah proteinů v neznámém vzorku.

D.8 Význam bílkovin a peptidů

Bílkoviny a peptidy jsou nezbytné k plnění základních životních funkcí. Proteiny plní stavební (kolagen, keratin), transportní (hemoglobin, transferin), obrannou (fibrin, imunoglobiny), katalytickou (enzymy), regulační (hormony, receptory) ale také nutriční funkci. Lipidy jsou zase důležitými podsložkami hormonů a ovlivňují chod celého organismu. Rovnovážný stav peptidů i proteinů je pro zdravotní stav člověka velice důležitý. Např. při nedostatku kolagenu může docházet k osteoporóze, řidnutí kostí. Celkově při nedostatku bílkovin dochází k oslabení imunity, zeslábnutí vlasů a nehtů, viditelným otokům a bolesti kloubů a svalů [5].

²⁸ Činidlo tvoří 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 modře, 50 ml 95% ethanolu, 100 ml kyseliny fosforečné a voda doplněna do litru [12].

Dodatek E. Další přírodní látky

Kromě nejrozsáhlejších a nejznámějších skupin přírodních látek, kterými je tvořena živá hmota, máme i další jejich významné deriváty a podskupiny. V této kapitole bylo čerpáno z [5].

E.1 Skupiny přírodních látek

Enzymy

Enzymy jsou po chemické stránce bílkoviny. Mají schopnost katalyzovat (urychlovat) biochemické reakce probíhající v živých buňkách. Většina enzymů působí uvnitř buněk tzv. intracelulárně, některé jsou z buněk vyloučené a působí mimo ni. Mnoho enzymů obsahuje kromě bílkovinné části nebílkovinnou skupinu, tzv. prostetickou skupinu. Enzymy mají na povrchu aktivní místo, kam se váže substrát. Vzniká tzv. kosubstrát, kde se bílkovině říká koenzym a prostetické skupině apoenzym. Narozdíl od anorganických katalyzátorů jsou enzymy citlivější na vnější vlivy, jsou v buňkách prostorově uspořádány a jsou účinnější. Enzymy urychlují chemické reakce tak, že sníží jejich aktivační energii a dosáhnou tak potřebného produktu rychleji.

Účinnost jednotlivých enzymů závisí na jejich aktivitě. Enzymová aktivita je velice citlivá na změnu pH. Ve skutečnosti je většina proteinů aktivních jen v rozmezí pH mezi 5–9. Dále ji ovlivňuje také koncentrace substrátu, teplota a přítomnost aktivátorů a inhibitorů. Aktivita enzymů bude podrobněji rozebrána v praktické části práce.

Enzymy jsou významnou součástí trávení, jelikož ovlivňují rychlost trávení a funkčnost trávicího traktu. K enzymům trávicího traktu řadíme:

- lipidy – žaludeční a pankreatické lipázy, pankreatické fosfolipázy
- sacharidy – amylázy (škrob, glykogen), sacharóza, isomaltóza, laktáza
- bílkoviny – pepsin, chymosin, trypsin, elastáza, karboxypeptidáza, aminopeptidáza
- nukleonové kyseliny – ribonukleáza, deoxyribonukleáza

Alkaloidy

Jako alkaloidy jsou označovány látky se silnými farmakologickými účinky, které jsou založené na dusíkaté bázi. Jsou to bezbarvé pevné látky, které jsou charakteristické svým zápachem a lze je destilovat. Jejich rozpustnost je závislá na přesném chemickém složení. K nejznámějším alkaloidům patří nikotin, efedrin, morfin, kodein a další látky.

Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů, což jsou těkavé organické látky obsahující hydroxylovou skupinu, které nejsou zařazovány mezi alkoholy. Jsou odvozené od flavanu, což je aromatická cyklická látka patřící do skupiny heterocyklických sloučenin. Flavonoidy jsou významnou součástí antioxidačních systémů, najdeme je v ovoci a zelenině.

Hormony

Hormony jsou vylučovány orgány nebo žlázami s vnitřní sekrecí. Chemicky je řadíme do skupiny vodorozpustných látek, k proteinům a peptidům a do skupiny hydrofobních látek. K vodorozpustným hormonům patří neurotransmitery, adrenalin a nonadrenalin, a cytokininy, histamin a serotonin. Z řady proteinů a peptidů můžeme uvést hormony insulin, glukagon, oxytocin, thyroxin, thyreotforní hormony, antidiuretický hormon, parathormon a další. K hydrofobním hormonům patří převážně steroidní hormony.

Vitaminy

Vitaminy nemohou vznikat v těle, musí být dodávány v potravě, jejich nedostatek způsobuje zdravotní potíže. Dělíme je na *vitamíny rozpustné v tucích* a na *vitamíny rozpustné ve vodě*. K vitaminům rozpustným v tucích patří vitamín A (retinol), důležitý pro zrakové ústrojí, vitamin D₃ (kalciol) a vitamin D₂ (erkalciol), které získáváme ze slunečního záření. Dále je rozpustný v tucích vitamin E, což je přírodní antioxidant, a vitamin K, jehož nedostatek způsobuje krvácení. Tato skupina vitaminů je v těle ukládána, proto může dojít i k nadbytku vitaminu v těle, to může způsobit zdravotní potíže. K vitaminům rozpustným ve vodě patří vitaminy skupiny B a vitamin C.

E.2 Stanovení enzymové aktivity

Určení optimálního pH pro činnost pepsinu

Do zkumavek napipetujeme 2,5 ml pufrů²⁹ o známých hodnotách pH (např. pH 2, pH 3 a další). Do poslední zkumavky dáme slepý vzorek. Do každé zkumavky přidáme 2 ml roztoku albuminu. Po 5 minutách přidáme čtyři dávky 0,5 ml pepsinu v intervalech 30 sekund. Nakonec přidáme vodu a necháme 30 minut reagovat. Reakci zastavíme trichloroctovou kyselinou, která zároveň vysráží nerozštěpené bílkoviny. Centrifugací odstraníme sraženinu a necháme ustálit. 2 ml vzniklého supernantu smícháme s 1 ml 2M roztoku NaOH a přidáme Biuretové činidlo. Poté měříme absorbanci proti příslušným slepým zkouškám v kyvetě při 530 nm. Naměřené absorbance jsou úměrné reakčním rychlostem [12].

Aktivita amylázy

Do sady zkumavek odpipetujeme 1 ml vody, přidáme asi 2 kapky roztoku jodu a zkumavky si označíme čísly 1–6. Do každé zkumavky přidáme tlumivé roztoky různých pH. I se stojánkem vložíme na 10 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C. Na porcelánové destičky si připravíme 2 kapky Lugolova roztoku a do zkumavek dáme 1 ml roztoku škrobu. Ze zkumavek odpipetujeme 1 ml na porcelánové destičky a sledujeme zabarvení. Daný postup opakujeme každou minutu, dokud se obsah na destičce nezbarví do modra. Z naměřeného času jsme schopni porovnat aktivitu amylázy při různých pH pufrů [14].

²⁹ Pufr je směs slabých kyselin a solí, která dokáže v jistém rozmezí udržet stabilní pH [12].

Dodatek F. Nukleové kyseliny

Společně s bílkovinami jsou nukleonové kyseliny považovány za nejvýznamnější složky živých soustav. Stavebními kameny nukleových kyselin jsou nukleotidy³⁰ a nukleosidy. V molekulách nukleových kyselin jsou dědičné informace buněk a jejich prostřednictvím se přepisují do bílkovinné struktury molekul. Nukleonové kyseliny jsou součástí buněčného jádra. Chemicky jsou to polynukleotidy složené až z milionů nukleotidů. Nukleotidy se propojují 3', 5'-fosfodiesterovými vazbami. Nejvýznamnějšími nukleovými kyselinami jsou kyselina deoxyribonukleová (DNA) a kyselina ribonukleová (RNA). Celý Dodatek F čerpá ze zdrojů: [11] a [5].

Jediná buňka lidského těla obsahuje asi čtyřmetrový řetězec kyseliny DNA. Ten je uchován v jádře o průměru 0,005 mm. V jádře jsou uloženy veškeré informace pro vytvoření lidského organismu. DNA řídí a udržuje při životě celý organismus. Vydává pokyny buňkám pro vytváření základních molekul bílkovin. Dlouhé molekuly této kyseliny jsou ukládány do chromozómů. Každý chromozóm obsahuje jednu dlouhou molekulu DNA mnohonásobně svinutou a obalenou bílkovinnou složkou. Geny jsou krátké úseky DNA, které nesou konkrétní informace o struktuře určitého znaku či vlastnosti. Celý soubor genů je označován jako genom. Každá buňka organismu nese nejméně jednu kopii základního informačního souboru.

F.1 Struktura DNA a RNA

Kód informace DNA pro tvorbu bílkovin je velice prostý. Genetická abeceda má jen čtyři písmena podle počátečních názvů jejich heterocyklických sloučenin (purinové a pyrimidinové báze):

- A – adenin (purinová báze)
- G – guanin (purinová báze)
- T – thymín (pyrimidinová báze)
- C – cytosin (pyrimidinová báze)

Každé vlákno DNA je tvořeno dvojitou šroubovicí. Je tvořeno řetězcem chemických jednotek navzájem spojených dohromady. Šroubovice je tvořena sacharidy, převážně potom D-ribosou. Pořadí bází v řetězci DNA tvoří genetický kód. Tři po sobě jdoucí písmena tvoří jedno genetické slovo, které obsahuje kód pro jednu stavební aminokyselinu (např. slovo GUC je pro aminokyselinu valin). Písmena se v jednotlivých slovech mohou opakovat. Pořadí slov v řetězci DNA musí být přesně přeneseno do pořadí v řetězci aminokyseliny, ty pak tvoří výslednou bílkovinu.

Každá z 20 nezbytných aminokyselin je vázána na některé z třípísmenných slov. Gen si lze představit jako napsanou zprávu obsahující desítky tisíc písmen, které popisují strukturu a vlastnosti bílkoviny. Kromě slov definujících aminokyseliny máme slova, která řetězce ukončují (UGA, UAA, UAG). Průměrná bílkovina se skládá z řetězce několika set aminokyselin a počet kombinací v řetězci DNA je nekonečný. V pořadí nukleotidů v DNA je zapsána dědičná informace buňky. DNA je tedy informační soubor buňky, který nikdy neopouští jádro. Jeho hlavním úkolem je chránit genetickou informaci před

³⁰ Nukleotid označuje spojení báze, heterocyklické sloučeniny a kyseliny fosforečné. Významným nukleotidem je např. ATP, který je hlavním zdrojem energie. Nukleosid je obdobné struktury, akorát neobsahuje kyselinu fosforečnou [11].

poškozením (nevhodných a špatným přepsáním).

Vlákná RNA jsou tvořena obdobně jako u DNA, akorát mají podobu jednošroubovice a jsou tvořeny jinými bázemi:

- A – adenin (purinová báze)
- G – guanin (purinová báze)
- C – cytosin (pyrimidinová báze)
- U – uracil (pyrimidinová báze)

Přestože základní informace o tvorbě bílkovin s nachází v jádře, zařízení umožňující vznik bílkovin je umístěno v cytoplazmě na vnější straně jaderné membrány. DNA se s tímto zařízením dorozumívá prostřednictvím molekul RNA. Na základě přesné specifikace funkce RNA ji dělíme podle druhu:







- a) **mediátorová (informační) RNA (mRNA)** – obsahuje přepis informace o primární struktuře bílkovin z molekuly DNA
- b) **transferová (přenosová) RNA (tRNA)** – přenáší aminokyseliny do místa syntézy bílkovin
- c) **ribozomová RNA (rRNA)** – je součástí ribozomů, což jsou části buněk, na nichž probíhá syntéza bílkovin


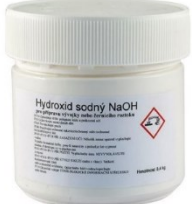
Správná stavba řetězců DNA a funkce RNA jsou velice důležité pro chod celého organismu. Při narušení genetického kódu dochází k mutacím genu a vznikají různá onemocnění a poškození funkce těla. Mutace natolik ovlivňují chod organismu, že mohou například i zvyšovat riziko rakoviny.

Dodatek G. Seznam pomůcek a materiálů

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	Zkumavka s kulatým dnem a vyhnutým okrajem, SIMAX	https://m.verkon.cz/zkumavka-s-kulatym-dnem-a-vyhnutym-okrajem-simax/
	Kádinka nízká s výlevkou, SIMAX	https://www.verkon.cz/kadinka-nizka-s-vylevkou-simax/
	Laboratorní váha VBRA AJ	http://www.eshopnetto.cz/950-produkt-713-laboratorni-vahy-vibra-aj.html
	Laboratorní kahan	https://www.verkon.cz/kahan-laboratorni/
	Držák na zkumavky	https://www.verkon.cz/drzak-na-zkumavky-o-prumeru-10-25-mm/

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	Vana skleněná hranatá	https://www.verkon.cz/vana-sklenena-hranata/
	Deska TLC ALUGRAM	https://www.verkon.cz/desky-tlc/
	Pipeta jednokanálová WITOPET professional, Witeg	https://www.verkon.cz/pipeta-jednokanalova-witopet-professional-witeg/?highlight=pipeta
	Kyveta spektrofotometrická	https://www.verkon.cz/kyvety-spektrofotometricke/
	Spektrofotometr UV/VIS, UV-6300PC	https://cz.vwr.com/store/
	Stojan laboratorní BUNSEN, kompletní	https://www.verkon.cz/stojan-laboratorni-bunsen-kompletni/

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	LLG kvalitativní filtrační papír	https://www.bdl.cz/laboratorni-pristroje
	Nálevka s krátkým stonkem, úhel 60°, SIMAX	https://www.verkon.cz/nalevka-s-kratkym-stonkem-uhel-60-simax/
	Podložní sklíčko s dutinkou	https://www.dalekohledy-mikroskopy.cz/p/mikroskopy-podlozni-sklicka-s-dutinkou#
	BMS D1-223 POL PLAN - polarizační mikroskop	https://www.dalekohledy-mikroskopy.cz/p/bms-d1-223-pol-plan-polarizacni-mikroskop
	pH-Fix indikační proužky, univerzální	https://www.bdl.cz/laboratorni-pristroje-3k/mereni-fyzikalnich-velicin-13k/ph-mereni-99k/ph-papirky-281k/ph-fix-indikacni-prouzky-univerzalni
	Ninhydrin	https://www.merckmillipore.com

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	Beta alanin	https://4fitness.cz/beta-alanin-1kg/
	Tyrosin	https://4fitness.cz/tyrosin-1-kg/
	Glycin	https://4fitness.cz/glycin-1-kg/
	Butanol	https://www.n2o3.com/
	Kyselina octová 80%	https://www.vceliobchod.cz/
	Hydroxid sodný	https://www.kondik.cz/hydroxid-sodny

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	Síran měďnatý	https://www.vmd-drogerie.cz/proxim-modra-skalice
	Urea, močovina	https://eshop.ekokoza.cz
	Hovězí sérový albumin BSA	https://www.biomol.com/
	Ethanol	https://www.chytrematerialy.cz/
	Kyselina fosforečná 85%	https://www.hanna-instruments.cz/kyselina-fosforecna---85-500-ml
	Dodecylsíran sodný, PlusOne	https://sk.vwr.com/store/

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	Coomassie Brilliant Blue G250	https://www.abbexa.com/
	Aceton	https://www.obic.cz/redidla
	Chloroform	https://www.laboratorium
	Kyselina sírová 96%	https://www.drogerie-ppv.cz/kyselina-sirova-1l-96-98-ean101112-skup101.php
	Lecitin	https://4fitness.cz/lecithin
	Lugolův roztok	https://www.resonancia.cz

Obrázek pomůcky/materiálu	Název	Odkaz
	Kyselina citronová	https://www.eva.cz/zbozi/
	Fosforečnan sodný	http://cz.ditaichemical.com/